

Untersuchungen zur Rolle des Monocarboxylattransporters 8 anhand des Knock-out Mausmodells

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades

d o c t o r r e r u m n a t u r a l i u m

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Dipl. Biol. Eva Katrin Wirth

Präsidentin/Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Dr. h.c. Christoph Marksches

Dekanin/Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Prof. Dr. Andreas Herrmann

Gutachter/innen:

1. Prof. Werner Kloas
2. Prof. Josef Köhrle
3. Prof. Klaudia Brix

Tag der mündlichen Prüfung: 27. Oktober 2010

Meinen Eltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	III
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	V
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	VII
TABELLENVERZEICHNIS	VIII
ZUSAMMENFASSUNG	IX
1. EINLEITUNG	1
1.1 SCHILDDRÜSENHORMONE	1
1.1.1 <i>Aufbau der Schilddrüse</i>	3
1.1.2 <i>Schilddrüsenhormonbiosynthese</i>	3
1.2 HYPOTHALAMUS-HYPOPHYSEN-SCHILDDRÜSEN-ACHSE	5
1.3 GESCHICHTE DES SCHILDRÜSENHORMONTRANSPORTES	6
1.4 IDENTIFIZIERUNG VON SCHILDDRÜSENHORMONTRANSPORTERN	8
1.5 DER MONOCARBOXYLATTRANSPORTER 8	9
1.6 ALLAN-HERNDON-DUDLEY-SYNDROM.....	10
1.7 SCHILDDRÜSENHORMONE WÄHREND DER ENTWICKLUNG.....	11
1.8 ZIELSETZUNG DER ARBEIT.....	12
2. MATERIAL UND METHODEN	13
2.1 MATERIALIEN.....	13
2.1.1 <i>Chemikalien</i>	13
2.1.2 <i>Geräte</i>	13
2.1.3 <i>Verbrauchsmaterialien</i>	14
2.1.4 <i>Vorgefertigte Reagenzsysteme (Kits)</i>	14
2.1.5 <i>Datenbanken</i>	15
2.1.6 <i>Software</i>	15
2.1.7 <i>Antikörper</i>	16
2.1.8 <i>Mauslinien</i>	16
2.2 METHODEN	17
2.2.1 <i>Probengewinnung</i>	17
2.2.2 <i>Probenaufarbeitung</i>	18
2.2.2.1 RNA-Isolierung	18
2.2.2.2 Proteinextraktion	18
2.2.2.3 Gewinnung von genomischer DNA zur Genotypisierung	19
2.2.3 <i>Molekularbiologische Methoden</i>	20
2.2.3.1 Genotypisierung mittels PCR	20
2.2.3.2 Primer.....	20
2.2.3.3 cDNA Synthese	22
2.2.3.4 qPCR.....	22
2.2.4 <i>Proteinbiochemische Methoden</i>	23
2.2.4.1 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bradford-Reagenz	24
2.2.4.2 SDS-Page	24
2.2.4.3 Western Blot.....	25
2.2.4.3.1 Transfer	25
2.2.4.3.2 Immunochemische Detektion	26
2.2.5 <i>Histologische Methoden</i>	26
2.2.5.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung)	27
2.2.5.2 Peroxidase-Färbung	28
2.2.5.3 Fluoreszenz-Färbung	29

2.2.6 Humane Proben.....	29
2.2.6.1 Western Blot.....	29
2.2.6.2 Histologische Präparate	29
2.2.7 Statistik	30
3. ERGEBNISSE	31
3.1 EXPRESSION VON MCT8 IN VERSCHIEDENEN GEWEBEN	31
3.1.1 Expression von Mct8 während der Entwicklung.....	31
3.1.2 Expression von Mct8 in der adulten Maus.....	32
3.1.3 Expression von Mct8 in adulten humanen Geweben	33
3.2 PHÄNOTYPISCHE CHARAKTERISIERUNG DER MCT8-DEFIZIENTEN MAUS.....	34
3.2.1 Allgemeine Beschreibung	34
3.2.2 Hör- und Sehfähigkeit.....	37
3.2.3 Hämatologische Untersuchung	38
3.2.4 Muskelfunktion.....	38
3.2.5 Gehirn und Nervensystem.....	39
3.2.6 Schilddrüse	48
3.2.6.1 Expression von Mct8 in der Schilddrüse	48
3.2.6.2 Veränderungen der Schilddrüse in Mct8-defizienten Mäusen	49
3.3 ANDERE SCHILDDRÜSENHORMONTRANSPORTER IN MAUS UND MENSCH	53
3.3.1 Expression von verschiedenen Transportern in der Schilddrüse	53
3.3.2 Expression von verschiedenen Schilddrüsenhormontransportern in Gehirnarealen der Maus während der Entwicklung.....	55
3.3.3 Expression von verschiedenen Transportern in Zelltypen des murinen Gehirns.....	57
3.3.4 Expression von Transportern in humanem Gehirn.....	59
3.3.5 Schilddrüsenhormontransporter in der humanen Gehirnentwicklung	60
4. DISKUSSION	63
4.1 GEWEBESPEZIFISCHE EXPRESSION VON MCT8	64
4.2 SCHILDDRÜSENHORMONWERTE.....	64
4.3 KÖRPERGEWICHT	66
4.4 HÖR- UND SEHFÄHIGKEIT	67
4.5 MUSKEL	68
4.6 MCT8-DEFIZIENZ IM GEHIRN	68
4.7 EXPRESSION VON MCT8 IN DER SCHILDDRÜSE	74
5. REFERENZEN	77
PUBLIKATIONEN	85
DANKSAGUNG	87
ERKLÄRUNG.....	89

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
18SrRNA	18S-Untereinheit der ribosomalen RNA
APS	Ammoniumpersulfat
bp	Basenpaare
cDNA	komplementäre DNA
ClO ₄ ⁻	Perchlorat
CSF	Cerebro-Spinal-Fluid (Liquor)
ct	<i>cycle of threshold</i>
DEPC	Diethylpyrocarbonat
Dio	Dejodase
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E	Embryonaltag
fwd	<i>forward</i>
g	Beschleunigung
GW	Gestationswoche
H ₂ O	Wasser
HPT-Achse	Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsen-Achse
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KO	<i>knock-out</i>
LAT	<i>L-type amino acid transporter</i>
M	Molar
mA	Milliampere
MCT	Monocarboxylattransporter
min	Minute
mm	Millimeter
mRNA	<i>messenger</i> RNA
ng	Nanogramm
NIS	Natrium-Jodid-Symporter
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
ns	nicht signifikant
NTCP	<i>Na⁺-taurocholate cotransporting polypeptide</i>
OATP	<i>organic anion transporting protein</i>
P	Postnaltag
PB	Phosphatpuffer
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PBST	Phosphat-gepufferte Salzlösung mit Tween
PCR	Polymerasekettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
qPCR	quantitative Real-Time PCR
rev	<i>reverse</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rT ₃	reverses T ₃
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
T ₂	Dijodthyronin
T ₃	Trijodthyronin
T ₄	Tetrajodthyronin

Abkürzungsverzeichnis

TBG	Thyroxin-bindendes Globulin
TBP	Thyroxin-bindendes Protein
Tg	Thyroglobulin
TPO	Thyreoperoxidase
TR α	Schilddrüsenhormonrezeptor alpha
TR β	Schilddrüsenhormonrezeptor beta
TRH	Thyrotropin-Releasing-Hormon
TSH	Thyreidea-stimulierendes Hormon
TTR	Transthyretin
V	Volt
wt	wildtyp
Xenopus l.	Xenopus laevis

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: verwendete Geräte	13
Tabelle 2: verwendete Reagenzsysteme	14
Tabelle 3: verwendete Datenbanken.....	15
Tabelle 4: verwendete Software	15
Tabelle 5: verwendete Antikörper.....	16
Tabelle 6: verwendete Lösungen für molekularbiologische Methoden	20
Tabelle 7: verwendete Primer	21
Tabelle 8: verwendete Lösungen für proteinbiochemische Methoden	24
Tabelle 9: Zusammensetzung der verwendeten Gele.....	25
Tabelle 10: verwendete Lösungen für histologische Methoden	27
Tabelle 11: Zusammensetzung der Hämatoxylin-Lösung	28
Tabelle 12: Zusammensetzung der Eosinlösung	28
Tabelle 13: Clickbox-Test.....	37
Tabelle 14: hämatologische Untersuchung	38
Tabelle 15: modifizierter SHIRPA Test – Teil 1: Verhalten bei Beobachtung in einem Glasgefäß	44
Tabelle 16: modifizierter SHIRPA Test – Teil 2: Bewegung in einer unbekannten Arena.....	45
Tabelle 17: modifizierter SHIRPA Test – Teil 3: Verhalten über bzw. in der Arena	46
Tabelle 18: Hyperalgesie bei Mct8 ^{-ly} Mäusen.....	47

Zusammenfassung

Schilddrüsenhormone sind essentiell für eine normale Entwicklung. Als geladene Proteine benötigen sie Transportproteine, um Zellmembranen zu durchqueren und ihre nukleären Rezeptoren zu erreichen. Ein solches Transportprotein, der Monocarboxylattransporter 8 (Mct8), wurde als spezifischer Transporter für Schilddrüsenhormone identifiziert und erlangte gesteigertes Interesse als Patienten mit Mutationen in MCT8 identifiziert wurden. Diese Patienten zeigen eine schwere X-gekoppelte mentale Retardierung mit einer muskulären Hypotonie. Ein weiteres prominentes Merkmal dieser Erkrankung, auch Allan-Herndon-Dudley-Syndrom genannt, sind veränderte Schilddrüsenhormonwerte im Serum. Mutationen in MCT8 führen zu stark erhöhten T₃-Spiegeln, erniedrigten T₄-Spiegeln sowie grenzwertig bis deutlich erhöhten TSH-Spiegeln. Um Mechanismen der Erkrankung und die Funktion von Mct8 genauer untersuchen zu können, wurde ein Knock-out Mausmodell für Mct8 generiert und mit dem menschlichen Phänotyp verglichen.

Das Mausmodell repliziert den menschlichen Phänotyp hinsichtlich der Schilddrüsenhormonparameter im Serum. Die *Mct8*-defiziente Maus zeigte jedoch keine muskuläre Hypotonie und in einem ersten grundlegenden Verhaltenstest keinerlei Auffälligkeiten. Morphologische Untersuchungen des Gehirns deuteten ebenfalls nicht auf eine gestörte Gehirnentwicklung hin. In detaillierten Verhaltenstests konnte in dieser Arbeit jedoch erstmalig ein ähnlich einer Hyperthyreose verändertes Angstverhalten sowie ein ähnlich einer Hypothyreose verändertes Putzverhalten dargestellt werden. Diese gegensätzlichen Phänotypen in Bezug auf Schilddrüsenhormone führten zu der Hypothese, dass es andere Schilddrüsenhormontransporter gibt, welche in manchen Zelltypen den Verlust von Mct8 kompensieren können. In kultivierten Nervenzellen und verschiedenen Abschnitten des murinen Gehirns konnten sechs weitere Schilddrüsenhormontransporter identifiziert werden, die sehr spezifische spatio-temporale Expressionsmuster aufweisen. Ein stark exprimierter Transporter mit einem ähnlichen Expressionsmuster wie Mct8 ist bei der Maus der L-Typ Aminosäuretransporter Lat2. Beim Menschen war während der Entwicklung eine starke Expression von MCT8 in Neuronen und anderen Zelltypen des Gehirns detektierbar. LAT2 ist jedoch anders als bei der Maus beim Menschen während der Entwicklung in Neuronen nicht nachweisbar. Die Schlussfolgerung daraus war, dass LAT2 bei der Maus, aber nicht beim Menschen, den Verlust von MCT8 kompensieren

kann. Die Existenz eines kompensierenden Transporters würde den deutlichen Unterschied zwischen *Mct8*-defizienten Mäusen und Menschen erklären.

Eine direkte Übertragbarkeit von Ergebnissen aus dem Mausmodell auf den Menschen muss also für jeden Zelltyp einzeln überprüft werden. Dennoch lieferte das Mausmodell gute Hinweise von denen sogar Patienten profitieren können. Bei *Mct8*-defizienten Mäusen konnte erstmals ein völlig neuer Phänotyp demonstriert werden: Sie entwickeln mit zunehmendem Alter Hyperplasien der Schilddrüse, die in alten Mäusen als papilläre Schilddrüsenkarzinome klassifiziert wurden. Mit diesen Erkenntnissen aus der Maus wurde ein Patient mit Allan-Henrdon-Dudley-Syndrom nochmals in Bezug auf Schilddrüsenabnormalitäten untersucht. Ähnliche Veränderungen konnten in der Tat in der Schilddrüse des Patienten nachgewiesen werden.

Das Mausmodell ist also nicht in allen Belangen mit dem Menschen vergleichbar, kann aber dennoch wichtige Hinweise für den Mechanismus des betroffenen Transporters und sogar Hinweise auf bisher unentdeckte Aspekte der Erkrankung liefern.

1. Einleitung

1.1 Schilddrüsenhormone

Als Schilddrüsenhormone werden die von der Schilddrüse sezernierten, geladenen Aminosäurederivate Thyroxin (Tetraiod-L-thyronin, 3,3',5,5'-Tetraiodothyronin, T_4) und Triiodthyronin (3,3',5-Triiod-L-thyronin, T_3) bezeichnet. Diese Hormone, ihre Vorläufer und Metabolite, sind die wichtigsten jodhaltigen Verbindungen bei Säugern. Deshalb wirkt sich Jodmangel primär auf die Schilddrüsenhormonachse aus. Schilddrüsenhormone kommen bei allen Vertebraten vor und konnten sogar bis zu Cnidariern und Chordatieren hin nachgewiesen werden (Spangenberg 1971). Es gibt keine Unterschiede zwischen Schilddrüsenhormonen von Menschen und Tieren.

T_3 wirkt über die Bindung an nukleäre Rezeptoren, Schilddrüsenhormonrezeptoren α und β ($TR\alpha$ und $TR\beta$), auf die Regulation von spezifischen Genen in bestimmten Zellen des Organismus (Oetting and Yen 2007). Da nur T_3 als aktive Form des Schilddrüsenhormons an Rezeptoren bindet, stellt die Prärezeptorregulation der lokalen Verfügbarkeit von T_3 eine wichtige Regulationsebene dar. Sowohl die Aufnahme von T_4 und T_3 in die Zelle als auch die lokale Verfügbarkeit von T_3 kann reguliert werden.

Da Schilddrüsenhormone geladene Aminosäurederivate sind, brauchen sie Transporter, um Zellmembranen durchqueren zu können. Verschiedene Schilddrüsenhormontransportproteine und ihre Entdeckung werden nachfolgend beschrieben.

Die Verfügbarkeit des aktiven Metaboliten T_3 kann aber auch durch lokale Dejodierung in der Zielzelle erfolgen. Zur Dejodierung von Schilddrüsenhormonen sind die Selenoenzyme Dejodase (Dio) 1-3 befähigt (Köhrle 2002). In Abbildung 1 wird dargestellt welche Dejodasen welche spezifischen Reaktionen der Dejodierung durchführen können. Die Konversion von T_4 zu T_3 erfolgt je nach gewebespezifischer Expression durch Dio1 oder Dio2. Die Konversion von T_4 zu reversem T_3 (rT_3) entspricht einer Inaktivierung des Schilddrüsenhormons, welche von Dio1 und Dio3 durchgeführt werden kann. T_3 wird über eine weitere Dejodierung zu T_2 inaktiviert. Sowohl aus T_3 als auch aus rT_3 können durch Dejodierung weitere Thyronine, durch Decarboxylierung Thyronamine entstehen (Bianco et al. 2002; Schweizer et al. 2008;

St Germain et al. 2009). Hierauf soll jedoch in der vorliegenden Arbeit nicht detailliert eingegangen werden.

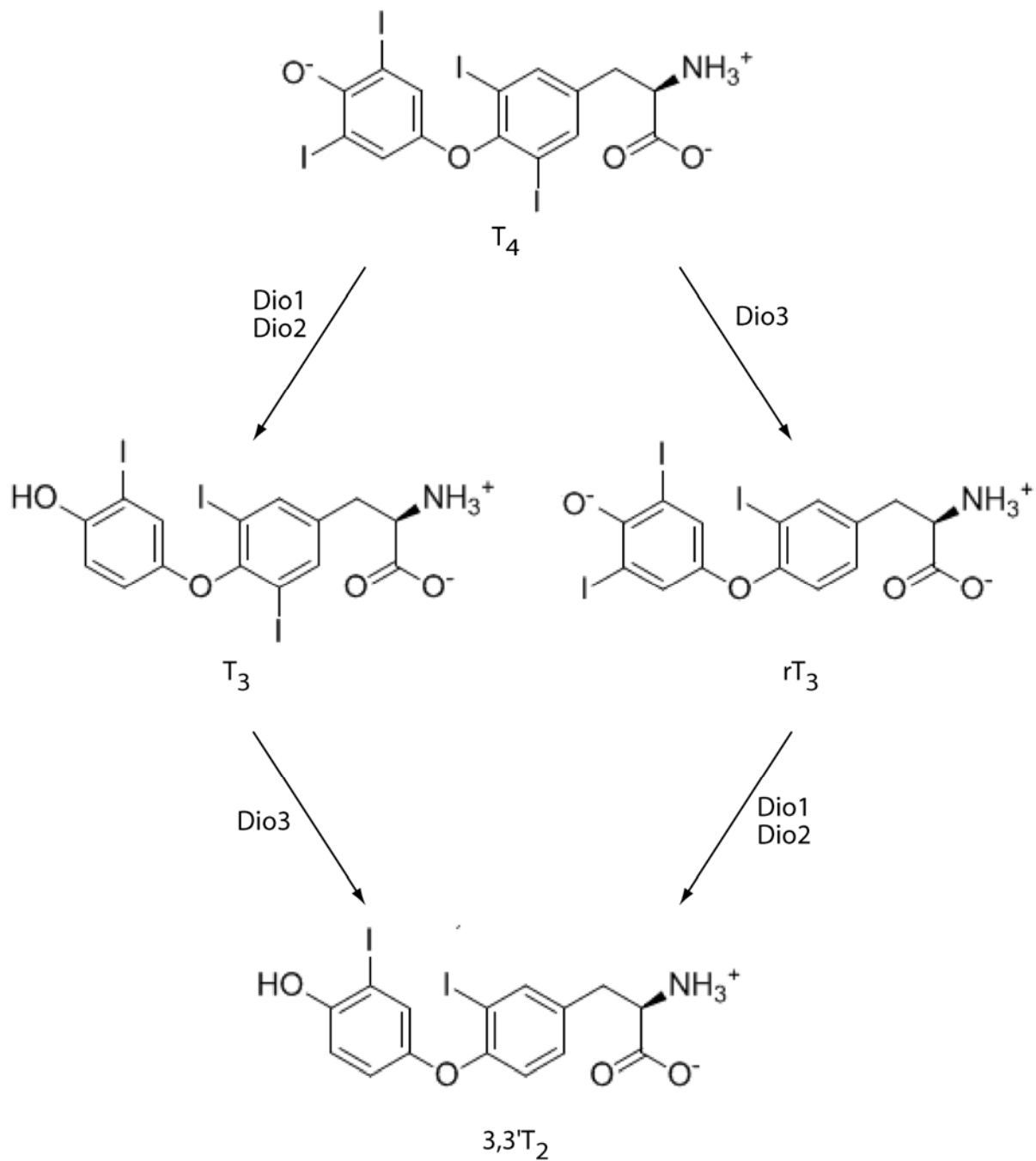


Abbildung 1: Aktivierung bzw. Inaktivierung von Schilddrüsenhormonen durch Dejodasen

T_4 wird entweder durch Dio1 oder Dio2 in die am Schilddrüsenhormonrezeptor aktive Form T_3 umgewandelt. Die Inaktivierung von T_4 und T_3 erfolgt durch Dio3.

Die erstmalige Synthese von T_4 erfolgte 1927 durch Harington und Barger (Harington and Barger 1927). T_3 konnte 1952 erstmals in humanem Plasma nachgewiesen werden (Gross and Pitt-Rivers 1952).

1.1.1 Aufbau der Schilddrüse

Die Schilddrüse besteht aus zwei Schilddrüsenlappen, die sich in Anlagerung an die Luftröhre unterhalb des Schildknorpels befinden. Beim Menschen, jedoch nicht bei der Maus, sind diese beiden Lappen über einen Isthmus verbunden. Funktionelle Einheiten in der Schilddrüse werden von Schilddrüsenfollikeln gebildet. Hierbei handelt es sich um ein kugelförmiges Epithel von Thyrozyten, in dessen Innerem sich das aus verschiedensten Proteinen bestehende Kolloid befindet. Hauptbestandteil dieses Kolloids ist das hormonbildende Protein Thyroglobulin (Tg). Assoziiert an die Thyrozyten befinden sich C-Zellen, welche das Hormon Calcitonin produzieren. Die einzelnen Schilddrüsenlappen sind von einer Bindegewebskapsel umgeben. Zwischen den einzelnen Follikeln befindet sich ein dichtes Kapillarnetz zur Versorgung der Zellen sowie zum Transport von Schilddrüsenhormonen und Jod (Abb. 2).

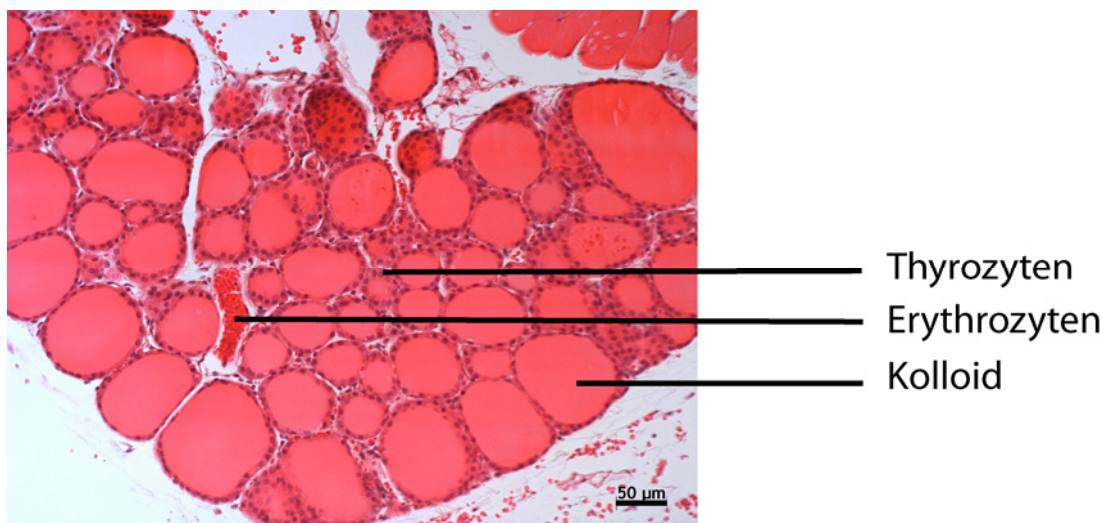


Abbildung 2: Histologisches Präparat einer murinen Schilddrüse

Die Schilddrüse besteht aus den funktionellen Einheiten der Schilddrüsenfollikel. Ein Follikel besteht aus einer einzelligen Schicht von Thyrozyten, die das Kolloid umschließen. Die unterschiedliche Dicke (Epithelhöhe) der Thyrozyten spiegelt ihre momentane Aktivität wider. Maßstabsbalken 50 µm

1.1.2 Schilddrüsenhormonbiosynthese

Schilddrüsenhormone werden in der Schilddrüse aus Thyroglobulin (Tg) synthetisiert. Dieses wird in den Thyrozyten gebildet und ins Follikellumen abgegeben (Arvan et al. 1997). Jod wird zunächst in den Organismus aufgenommen und in der Schilddrüse organifiziert. Zunächst erfolgt die Aufnahme von Jodid in die Thyrozyten über den an

der basolateralen Membran lokalisierten Natrium-Jodid-Symporter (NIS) (Dai et al. 1996; Dohan et al. 2003). Dieser transportiert, unter Zuhilfenahme des durch die Na^+/K^+ -ATPase entstandenen Natriumgradienten, Jodid zusammen mit zwei Natriumatomen in die Thyrozyten. NIS ist ebenso in der Lage neben Jodid auch große Anionen wie Cyanat, Thiocyanat oder Nitrat zu transportieren. Perchlorat (ClO_4^-) inhibiert den Jodidtransport durch NIS und wird zur Behandlung einer Schilddrüsenüberfunktion bzw. zur experimentellen Erzeugung eines Jodmangelkropfes verwendet (De La Vieja et al. 2000). Über den apikal lokalisierten Ionenkanal Pendrin wird das Jodid in das Lumen des Follikels abgegeben (Royaux et al. 2000). Membranassoziierte Thyroperoxidasen (Duox1/2) erzeugen H_2O_2 , welches die in der apikalen Membran lokalisierte TPO zur Oxidation des Jodid und anschließender Jodierung von Tyrosinresten im Tg nutzt (De Deken et al. 2000). Die hier entstandenen Mono- und Dijodtyrosine (MIT und DIT) werden TPO-abhängig am Tg zu T_4 und T_3 gekoppelt (Taurog 1996). Bei einer ausreichend vorhandenen Jodversorgung wird am Tg hauptsächlich T_4 gebildet; es besteht jedoch ebenfalls die Möglichkeit der direkten Bildung von T_3 , welches dann ebenfalls zusammen mit Tg im Kolloid vorliegt. Die Freisetzung der Schilddrüsenhormone erfolgt über Proteolyse, an der Cathepsine beteiligt sind. Nach einer Auflösung des Kolloids und apikaler Pinozytose verschmelzen die Vesikel mit Lysosomen, in denen eine weitere ebenfalls Cathepsin-vermittelte Freisetzung von T_4 und T_3 erfolgt (Friedrichs et al. 2003). Es erfolgt ein Übergang der Hormone in das Blut, wo sie an Transportproteine wie Thyroxin-bindendes Globulin (TBG), Albumin und Transthyretin (TTR) gebunden und zu ihren Bestimmungsorten transportiert werden (Richardson 2007). Eine mögliche Erklärung für den basolateralen Übergang der Hormone in die Blutbahn soll in der vorliegenden Arbeit diskutiert werden.

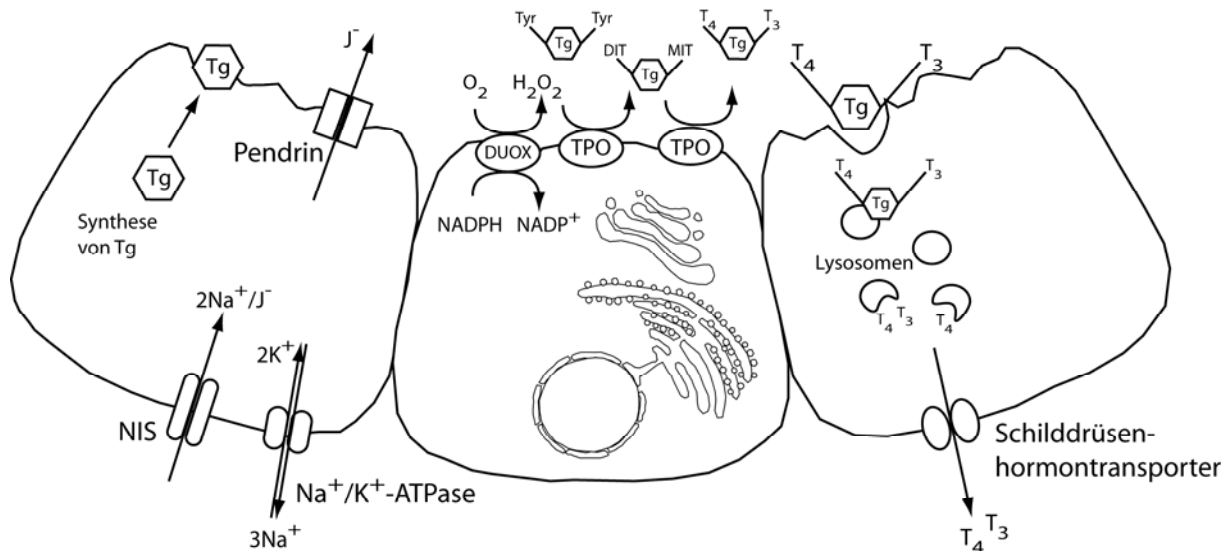


Abbildung 3: Schilddrüsenhormonbiosynthese

Thyroglobulin (Tg) wird in den Thyrozyten gebildet und ins Follikellumen sezerniert. Jodid wird über NIS in Thyrozyten aufgenommen und über Pendrin ebenfalls ins Follikellumen abgegeben. Dort erfolgt die H_2O_2 -abhängige Jodierung von Tyrosinresten des Tg mit Hilfe der TPO. MIT und DIT werden ebenfalls durch TPO zu T_4 und T_3 gekoppelt. Die Speicherung von Schilddrüsenhormonen erfolgt im Kolloid des Follikellumens. Zur Freisetzung von Schilddrüsenhormonen wird das Kolloid durch Cathepsine aufgelöst und Tg durch Pinozytose internalisiert. Nach der Verschmelzung mit Lysosomen erfolgt eine Cathepsin-vermittelte Freisetzung von T_4 und T_3 sowie der darauf folgende Transport der Schilddrüsenhormone aus den Thyrozyten ins Blut.

1.2 Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsen-Achse

Die Regulation der Ausschüttung von Schilddrüsenhormonen erfolgt über die Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsen-Achse (HPT-Achse). Im Hypothalamus erfolgt eine pulsatile Sekretion des Neuropeptides *Thyrotropin-Releasing-Hormone* (TRH), welches durch Prohormonkonvertasen, sowie eine Amino- und Carboxypeptidase aus seinem Vorläuferprotein Prä-Pro-TRH erzeugt wurde. Das TRH gelangt über den Portalkreislauf des Hypophysenstiels in die Hypophyse und stimuliert dort die thyreotropen Zellen des Hypophysenvorderlappens zur Bildung von Thyreoidea-stimulierendem Hormon (TSH). TSH stimuliert über seine Bindung an den TSH-Rezeptor in der basolateralen Membran der Thyrozyten die Synthese von Tg und seine Jodierung, sowie die Freisetzung von Tg aus dem Kolloid, den lysosomalen Abbau desselben und die Freisetzung von T_4 . Über einen negativen Rückkopplungsmechanismus wird die Freisetzung von Schilddrüsenhormonen gezielt gesteuert. So wirken T_4 und T_3 sowohl negativ auf die Synthese von TSH als auch auf die Synthese von TRH und regulieren somit an zwei Stellen der HPT-Achse ihre eigene Verfügbarkeit und Sekretion (Abb. 4).

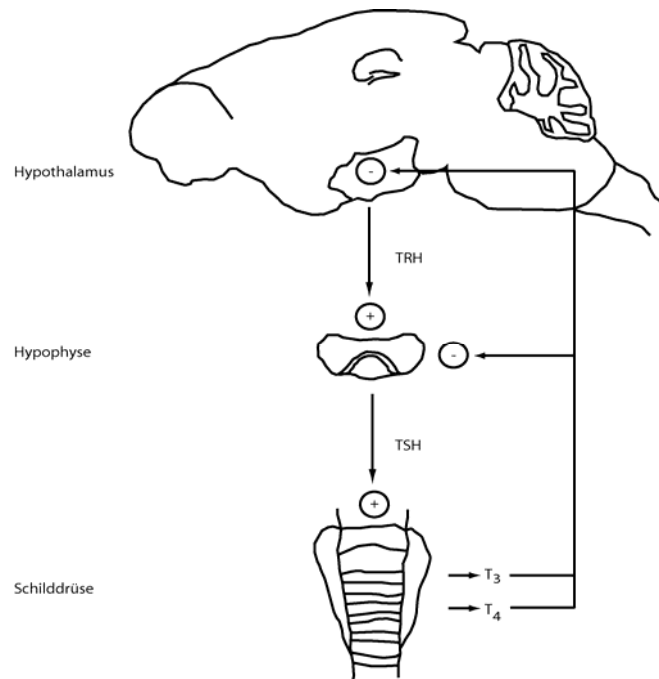


Abbildung 4: Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsen-Achse am Beispiel der Maus

Das im Hypothalamus gebildete TRH wirkt in der Hypophyse positiv auf die Sekretion von TSH, welches die Freisetzung von Schilddrüsenhormonen aus der Schilddrüse stimuliert. Diese wirken über einen negativen Rückkopplungsmechanismus sowohl auf die Sekretion von TSH als auch TRH. T₄ kann in peripheren Geweben in T₃ umgewandelt werden.

1.3 Geschichte des Schilddrüsenhormontransportes

In den 50er bis 70er Jahren wurde eine Reihe von Studien zur Aufnahme von Schilddrüsenhormonen in Gewebe publiziert, die zu dem Schluss kamen, dass der Übergang der Schilddrüsenhormone in die Zelle ein passiver Prozess sei. Freinkel et al. machten Versuche mit Gewebeschnitten aus Herz, Leber und Niere verschiedener Spezies und kamen zu dem Schluss, dass die Verteilung von Schilddrüsenhormonen zwischen extra- und intrazellulärem Kompartiment nur von der Bindungskapazität des Thyroxin-bindenden Proteins (TBP) abhängig sei, während ungebundenes Hormon die Zellmembran passiv passieren würde (Freinkel et al. 1957). Diese Ergebnisse wurden in Erythrozyten mit der gleichen Schlussfolgerung repliziert (Crispell and Coleman 1956; Hamolsky et al. 1957). Weiterführende Studien wurden mit radioaktiv markiertem Schilddrüsenhormon durchgeführt. Eine Studie mit Schnitten von Rattennieren fand heraus, dass die Aufnahme von T₄ in das Gewebe ebenso von der Konzentration von TBP abhängig sei (Beraud et al. 1958). Versuche zur Kinetik der Aufnahme von Schilddrüsenhormonen mit Ratten Diaphragmen ergaben Bindungskurven, die als

zweistufiger Prozess, eine einfache Diffusion ins Gewebe als limitierender Schritt und eine Bindung an zelluläre Proteine, interpretiert wurden (Lein and Dowben 1961). Ein aktiver Transport wurde hier nicht in Betracht gezogen. Hillier publizierte mehrere Studien zu Aufnahme und Freisetzung von T_3 und T_4 . Hierzu verwendete er das System des isolierten perfundierten Herzens verschiedener Spezies, wie auch isolierte, perfundierte Leber. Er zeigte, dass die Aufnahme von T_3 und T_4 ein Equilibrium erreicht, welches weder durch die freie Hormonkonzentration, noch durch Temperaturänderungen beeinflusst werden konnte und folgte daraus abermals eine einfache Aufteilung des Hormons zwischen Kompartimenten durch Diffusion. Auch hier wurden zwei Komponenten in der Aufnahmekinetik gemessen, die wie folgt erklärt wurden: Die erste schnelle Komponente sollte die Aufnahme von freiem Schilddrüsenhormon darstellen, wohingegen die zweite langsamere die Aufnahme des Hormons nach der langsamen Freisetzung aus seinem Bindeprotein darstellen sollte (Hillier 1968; Hillier 1969b; Hillier 1969a). Die bisher dargestellten Ergebnisse lassen sich in der 1960 von Robbins und Rall publizierten „freien Hormonhypothese“ zusammenfassen, die besagt, dass die Konzentration an freiem Schilddrüsenhormon limitierend für die Verteilung des Hormons sei (Robbins and Rall 1960).

Andere Arbeitsgruppen, die sich zur gleichen Zeit mit der zellulären Aufnahme von Schilddrüsenhormonen beschäftigten, kamen bereits zu dem Schluss, dass die Aufnahme keinen passiven Prozess darstellt. Christensen *et al.* arbeiteten über die Aufnahme von Aminosäuren in Aszites-Karzinomzellen und untersuchten in diesem Rahmen auch die Aufnahme von Schilddrüsenhormonen. Die starke Konzentration von Schilddrüsenhormonen innerhalb der Zelle zeigte für sie, dass ein Prozess der Erhöhung der intrazellulären Konzentration vorliegt, welcher mit passiver Diffusion nicht zu vereinbaren wäre (Christensen *et al.* 1954). Hogness *et al.* untersuchten die Schilddrüsenhormonaufnahme an Hand von Diaphragmen der Ratte. Sie fanden eine zeitabhängige Aufnahme sowie eine starke Bindung der Hormone an das Gewebe und beschreiben ihre Ergebnisse als aktiven Transport und aktive Bindung im Gewebe (Hogness *et al.* 1957).

Ende der 1970er Jahre konnte in unabhängigen Studien gezeigt werden, dass die Aufnahme von Schilddrüsenhormonen ein energieabhängiger, sättigbarer Prozess ist (Krenning *et al.* 1978; Eckel *et al.* 1979; Krenning *et al.* 1979). Krenning *et al.* führten Versuche mit isolierten Rattenleberzellen durch und konnten zeigen, dass die Aufnahme von T_3 nicht linear zur freien Hormonkonzentration ist und somit ein

Transport stattfinden muss (Krenning et al. 1978). Eckel et al. arbeiteten ebenfalls mit isolierten Rattenleberzellen und zeigten durch Versuche mit cytosolischen Fraktionen und isolierten Plasmamembranen zusätzlich, dass cytosolische Proteine nicht für die Aufnahme von Schilddrüsenhormonen in die Zelle verantwortlich sind. Die Aufnahme von Schilddrüsenhormonen in isolierte Plasmamembranen zeigt die gleiche Kinetik wie bei intakten Zellen. Diese Experimente belegten einen erleichterten Transport an der Plasmamembran (Eckel et al. 1979). Weitere Studien fanden statt, bis hin zur Identifizierung und Charakterisierung des spezifischen Schilddrüsenhormon-transporters Mct8 (Friesema et al. 2003).

1.4 Identifizierung von Schilddrüsenhormontransportern

Anhand der im vorherigen Kapitel beschriebenen Versuche und Ergebnisse zur Aufnahme von Schilddrüsenhormonen in Zellen und Gewebe ließ sich ein spezifischer Transport nicht mehr ausschließen. Allerdings erschien erst im Jahr 1997 eine Publikation von Docter et al., die erstmalig einen Ansatz zur Identifizierung von Transportproteinen für Schilddrüsenhormone in der Leber beschrieb. Hierzu wurde die Aufnahme von radioaktiv-markierten Schilddrüsenhormonen in Oozyten des Krallenfrosches *Xenopus laevis* gemessen. Die Injektion von cDNA Fraktionen aus Rattenleber führte zu einer deutlichen Steigerung der Aufnahme von T₃ und T₄ in die Zellen. Eine vorherige Fraktionierung der RNA in einem Rohrzuckergradienten erlaubte die Einschränkung auf eine oder mehrere für den Transport zuständige mRNAs mit einer Größe von 0,8-2,1 kb (Docter et al. 1997). 1999 gelang es der gleichen Arbeitsgruppe, die Aufnahme von Schilddrüsenhormonen über die vorher als Gallensäuretransporter bzw. multispezifischer Transporter beschriebenen Proteine Slc10a1 (Ntcp) und Slco1a1 (Oatp1) in transfizierten *Xenopus l.* Oozyten nachzuweisen (Friesema et al. 1999). Gleichzeitig zeigten Abe et al. den Transport von Schilddrüsenhormonen in transfizierte Oozyten durch zwei weitere Transporter, Slco1a4 (Oatp2) und Slco1a5 (Oatp3) (Abe et al. 1998). Ein weiteres Transportprotein wurde 2000 identifiziert. Auch Slco1b2 (Oatp4) erleichtert die Aufnahme von T₃ und T₄ in *Xenopus l.* Oozyten (Cattori et al. 2000).

Slco4a1 (Oatp12) transportierte in Versuchen mit transfizierten Oozyten ebenfalls Schilddrüsenhormone (Fujiwara et al. 2001). Da Schilddrüsenhormone geladene Aminosäurederivate sind, lag die Idee nahe, den Schilddrüsenhormontransport von

Aminosäuretransportern zu untersuchen. Der Aminosäuretransport durch das System-L wurde bereits seit den achtziger Jahren beschrieben. Das System besteht aus einer schweren Kette, 4F2hc, sowie zwei leichten Ketten, Lat1 (Slc7a5) und Lat2 (Slc7a8). Lat1 wurde bereits 1994 als E16/Ta1 kloniert und 1998 als leichte Kette Lat1 identifiziert (Maglott et al. 1994; Mannion et al. 1998). Lat2 wurde 1999 über einen bioinformatischen Ansatz identifiziert, kloniert und dem System-L zugeordnet (Bassi et al. 1999). Die Gruppe um Friesema wies in injizierten *Xenopus l.* Oozyten den Transport von T_4 , T_3 , rT_3 und $3,3'$ - T_2 durch Lat1 und Lat2 in Kombination mit ihrer *heavy chain*, 4F2hc, nach (Friesema et al. 2001). Der Transport von Schilddrüsenhormonen durch Lat1 wurde bereits vorher an seinem *Xenopus l.* Homolog, IU12, gezeigt (Ritchie et al. 1999). Der erste für das Gehirn spezifische Schilddrüsenhormontransporter ist Oatp14 (Slco1c1). Das Protein wurde sowohl aus humanem als auch aus Rattengewebe kloniert und zeigt bei einer Expression in CHO-, bzw. HEK293-Zellen einen Transport von T_4 und T_3 (Pizzagalli et al. 2002; Sugiyama et al. 2003). Eine detailliertere Charakterisierung zeigte die Expression von Oatp14 in Kapillaren und Endothelien des Gehirns sowie dem Plexus choroideus (Sugiyama et al. 2003). Im gleichen Jahr wurden zwei Testis-spezifische Schilddrüsenhormontransporter, Slco6b1 und Slco6c1, identifiziert (Suzuki et al. 2003). Die Identifizierung von Mct8 als spezifischer Schilddrüsenhormontransporter gelang wiederum der Gruppe von T. Visser (Friesema et al. 2003). Nur ein Jahr später kam ein Schilddrüsenhormontransporter in der Niere hinzu, Slco4c1 (Mikkaichi et al. 2004). Der bisher neuste identifizierte Schilddrüsenhormontransporter stammt wiederum aus einem Aminosäuretransportsystem, dem System-T. Mct10 (Slc16a10) wurde 2001 kloniert und 2002 als Aminosäuretransporter charakterisiert (Kim et al. 2001; Kim et al. 2002). Friesema et al. konnten 2008 einen Transport von T_4 und T_3 durch Mct10 zeigen (Friesema et al. 2008).

Bisher bekannte Klassen von Transportern, die Schilddrüsenhormone transportieren, sind also: OATPs, System-L-Aminosäuretransporter und Monocarboxylattransporter.

1.5 Der Monocarboxylattransporter 8

Der Monocarboxylattransporter 8 (Mct8, auch Slc16a2) ist ein Transmembranprotein mit zwölf vorhergesagten Transmembrandomänen, welches zur Klasse der *major facilitator superfamily* gehört. Das Gen für Mct8 befindet sich auf dem X-Chromosom

und kodiert bei der Maus für ein Protein mit 546 Aminosäuren; beim Menschen enthält das Protein 613 Aminosäuren. Hieraus ergibt sich eine Masse von ca. 59 kDa bei der Maus und ca. 67 kDa beim Menschen. Das größere Protein des Menschen ergibt sich aus einem verlängerten N-Terminus mit einem zweiten Startcodon. Aus der humanen Sequenz mit zwei alternativen Startcodons können beide Startcodons translatiert werden und Proteine beider Massen entstehen. Ist das erste Startcodon vorhanden wird jedoch bevorzugt das längere Protein gebildet (Kinne et al. 2009). Mct8 wurde 1994 von Lafreniere et al. als *X-linked PEST-containing transporter* kloniert. Aus diesem Namen ergibt sich schon, dass Mct8 im N-Terminus eine PEST-Sequenz enthält. Diese ist normalerweise das Signal für einen schnellen Abbau des Proteins (Lafreniere et al. 1994). Mct8 konnte 2003 als Transporter für Schilddrüsenhormone mit einer hohen Affinität für T_3 , T_4 und rT_3 identifiziert werden (Friesema et al. 2003). Mct8 ist nicht glykosyliert und kann nicht wie andere Transporter der MCT-Familie mit Basiginin, sondern nur mit sich selbst dimerisieren (Biebermann et al. 2005; Visser et al. 2009b). Es konnte ebenso gezeigt werden, dass sowohl Aufnahme als auch Efflux von Schilddrüsenhormonen durch Mct8 energieunabhängig sind (Visser et al. 2009a).

1.6 Allan-Herndon-Dudley-Syndrom

Nach der Identifizierung von Mct8 als spezifischem Schilddrüsenhormontransporter dauerte es nicht lange bis zur Beschreibung der ersten Patienten mit Mutationen in MCT8 (Dumitrescu et al. 2004; Friesema et al. 2004). Schwartz et al. konnten 2005 Mutationen in MCT8 bei bereits vorher beschriebenen Familien mit X-gekoppelter mentaler Retardierung nachweisen (Schwartz et al. 2005). Diese Familien waren zum Teil 1944 von Allan, Herndon und Dudley untersucht und ihre Symptome als Syndrom der mentalen Retardierung mit muskulärer Hypotonie beschrieben worden (Allan et al. 1944). Aus dieser Erstbeschreibung leitet sich der nun gebräuchliche Name Allan-Herndon-Dudley-Syndrom ab. Besondere Merkmale dieser Erkrankung, welche allerdings von Allan, Herndon und Dudley noch nicht erkannt worden waren, sind spezifisch veränderte Schilddrüsenhormonparameter im Serum. Patienten mit Mutationen in MCT8 zeigen deutlich erhöhte T_3 -Spiegel, erniedrigte T_4 -Spiegel und in diesem Zusammenhang normale bis sogar erhöhte TSH-Werte. Durch die ungewöhnliche Konstellation dieser Parameter ist es diagnostisch nötig, nicht nur

TSH, sondern auch T_3 und T_4 bei Patienten zu bestimmen. Bis heute wurden bereits mehr als 45 Familien mit verschiedenen Mutationen in MCT8 diagnostiziert (Friesema et al. 2010). Bei mehreren dieser Patienten wurde eine Hypomyelinisierung gefunden, die jedoch mit zunehmendem Alter verschwindet (Holden et al. 2005; Namba et al. 2008; Papadimitriou et al. 2008; Sijens et al. 2008; Vours-Barriere et al. 2009). Es ist anzunehmen, dass aufgrund der oft normalen bis nur leicht erhöhten TSH-Spiegel viele Patienten mit Hypomyelinisierung und X-gekoppelter mentaler Retardierung nicht genauer auf veränderte Schilddrüsenhormonwerte hin untersucht werden und somit nicht die Diagnose Allan-Herndon-Dudley-Syndrom gestellt wird.

1.7 Schilddrüsenhormone während der Entwicklung

Schilddrüsenhormone sind in vielen Organismen, besonders in Vertebraten, für eine normale Entwicklung vonnöten. So ist z. B. die Metamorphose von Amphibien ein gut untersuchtes Modell für eine schilddrüsenhormonabhängige Entwicklung. Anhand der Resorption des Schwanzes und der Außenkiemen und der Umwandlung von Lunge, Gastrointestinaltrakt und des Nervensystems konnte gezeigt werden, dass sowohl das Vorhandensein von Schilddrüsenhormonen als auch die zeitliche und lokale Regulation der Menge an Schilddrüsenhormonen eine Rolle spielen (Ishizuya-Oka et al. 2009). Insbesondere die Entwicklung des Nervensystems ist auch bei Säugetieren und Menschen bekanntermaßen schilddrüsenhormonabhängig. Die Anwesenheit von Schilddrüsenhormonen ist sowohl für die Entwicklung von Nervenzellen, wie auch für das Entstehen von höheren Funktionen, wie Lernen und Gedächtnis, aber auch für die Feinmotorik notwendig. Der Zeitpunkt und die Dauer der Hypothyreose während der Entwicklung spielen eine bedeutende Rolle für die Ausprägung der entstehenden Schädigungen (Zoeller and Rovet 2004). Prozesse im Gehirn, die von einer normalen spatio-temporalen Verteilung von Schilddrüsenhormonen im Gehirn abhängig sind, wären z. B. die Migration von Neuronen in Neokortex und Kleinhirn (Auso et al. 2004), die Verzweigung von Dendritenbäumen der Purkinje-Zellen im Kleinhirn (Heuer and Mason 2003), die Reifung von inhibitorischen Interneuronen (Gilbert et al. 2007) sowie die Reifung und Differenzierung von Oligodendrozyten und Mikroglia (Barres et al. 1994; Lima et al. 2001; Jones et al. 2003; Sharlin et al. 2008). Bekannte Zielzellen, die während ihrer

Entwicklung von Schilddrüsenhormonen abhängen, sind die inneren Haarzellen der Cochlea und die Photorezeptoren der Retina. Hier konnte mit Hilfe von Mausmodellen gezeigt werden, dass ein bestimmtes spatio-temporales Verteilungsmuster von Schilddrüsenhormonen notwendig ist. Dejodasen spielen in beiden Organen eine wichtige Rolle in der zeitlichen und örtlichen Begrenzung des Vorhandenseins von T_3 (Ng et al. 2004; Roberts et al. 2006; Ng et al. 2009; Ng et al. 2010).

1.8 Zielsetzung der Arbeit

Die Entdeckung von Mct8 als spezifischem Schilddrüsenhormontransporter und die Assoziation von Mutationen in MCT8 mit dem Allan-Herndon-Dudley-Syndrom erweckten neues Interesse an der Erforschung von Schilddrüsenhormontransportern. Verschiedene Schilddrüsenhormontransporter waren bereits innerhalb der letzten Jahre identifiziert worden. Ihre physiologische Rolle wurde aber bisher nie im genetischen Modell untersucht. Mutationen im *MCT8* Gen erzeugen beim Menschen eine schwere Form der X-gekoppelten mentalen Retardierung mit veränderten Schilddrüsenhormonspiegeln im Blut, deren Ursprung bisher nicht vollständig erklärt wurde. Um die Entstehung und zugrundeliegenden Mechanismen der Erkrankung untersuchen zu können, wurden *Mct8*-defiziente Mausmodelle generiert.

In dieser Arbeit sollten im *Mct8*-defizienten Mausmodell die neurologischen (Entwicklungs-)störungen histologisch und molekular untersucht werden. Erste Daten deuteten jedoch an, dass bei *Mct8*-defizienten Mäusen keine massiven neurologischen Störungen vorliegen. Deshalb wurde eine detailliertere Untersuchung des Verhaltens und der Gehirnmorphologie von *Mct8*-defizienten Mäusen notwendig. Analysen von anderen Organen der Maus, die bekanntermaßen von einer fehlerhaften Regulation von Schilddrüsenhormonen betroffen sind, sollten mögliche Hinweise auf bisher beim Menschen unentdeckte Aspekte der Erkrankung liefern. Des Weiteren sollte die Hypothese überprüft werden, ob in der Maus alternative Schilddrüsenhormontransporter exprimiert sind, die möglicherweise zum phänotypischen Unterschied zwischen Mensch und Maus beitragen könnten.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien

Die für die Versuche verwendeten Chemikalien wurden, soweit nicht gesondert vermerkt, in den höchsten verfügbaren Reinheitsgraden bei folgenden Herstellern bzw. Vertrieben erworben: ABgene Thermofisher (Epsom, UK), Bio-Rad Laboratories (München), Boehringer (Mannheim), Carl Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Roche Diagnostik (Mannheim), Serva Feinbiochemika (Heidelberg), Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim) und VWR International (Hannover).

Detaillierte Rezepte der verwendeten Puffer und Lösungen werden in den Beschreibungen der Methoden gegeben.

2.1.2 Geräte

In Tabelle 1 sind die bei der Arbeit verwendeten Geräte aufgeführt. Spezielle Geräte finden in der jeweiligen Methode Erwähnung.

Tabelle 1: verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
Autoklav Varioklav	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Axioskop 2 mot plus	Carl Zeiss (Oberkochen)
Biophotometer	Eppendorf (Hamburg)
DELFIAPlateShake	PerkinElmer (Rodgau-Jügesheim)
Elektrophoresekammer vertikal	Bio-Rad Laboratories (München)
Elektrophoresekammer horizontal	Carl Roth (Karlsruhe)
iCycler™ Thermal Cycler	Bio-Rad Laboratories (München)
inverses Mikroskop Wilovert 30 Standard	Hund (Wetzlar)
Magnetrührer Modell L32	A. Hartenstein (Würzburg)
Kühlzentrifuge 5417R	Eppendorf (Hamburg)
Leica CM 3000 Kryostat	Leica (München)
Leica RM2125RT Mikrotom	Leica (München)
Mastercycler® gradient	Eppendorf (Hamburg)
Microdismembrator Modell U	B. Braun Biotech (Melsungen)
Mikrowelle M501	Whirlpool (Schorndorf)
Netzgerät BluePower PLUS	SERVA (Heidelberg)
Netzgerät EPS 601 Power Supply	Amersham Biosciences (Freiburg)
pH-Meter inoLab Benchtop	WTW (Weilheim)
Pipetten Eppendorf research 0,1-2,5 µl, 0,5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl	Eppendorf (Hamburg)

Pipettierhilfe acu-jet pro	A. Hartenstein (Würzburg)
Präparierbesteck	FST Fine Science Tools GmbH (Heidelberg)
Photometer NanoDrop 1000	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Röntgenfilmkassette	Kodak (Rochester, USA)
Tischphotometer Biophotometer	Eppendorf (Hamburg)
Transferblotapparatur Transblot SD	Bio-Rad Laboratories (München)
Ultraschallstab Labsonic M	B. Braun Biotech (Melsungen)
Ultra-Turrax T18	IKA (Staufen)
UV-Transilluminator V-90 M	Benda (Weisloch)
Vortex	A. Hartenstein (Würzburg)
Waage CP 2201	Sartorius (Göttingen)

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Übliche Verbrauchsmaterialien für den Laborbedarf wurden, soweit nicht gesondert angegeben, von folgenden Herstellern bzw. Vertrieben bezogen: A. Hartenstein (Würzburg), B. Braun Biotech International (Melsungen), Becton Dickinson (Heidelberg), Bio-Rad Laboratories (München), Invitrogen (Karlsruhe), Merck Biosciences (Schwalbach), Carl Roth (Karlsruhe), Eppendorf (Hamburg), peqLab Biotechnologie (Erlangen), Sarstedt (Nümbrecht), Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim) und VWR International (Hannover).

2.1.4 Vorgefertigte Reagenzsysteme (Kits)

In Tabelle 2 sind die bei dieser Arbeit verwendeten, käuflich erwerblichen Reagenzsysteme aufgelistet.

Tabelle 2: verwendete Reagenzsysteme

Reagenzsysteme	Bezugsquelle
ABsolute qPCR SYBR Green Mix	Abgene (Epsom, UK)
Amersham ECL™ Western Blotting Detection Reagents	GE Healthcare (Little Chalfont, UK)
Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate	Bio-Rad Laboratories (München)
LSAB+ System	Dako (Glostrup, Dänemark)
M.O.M Kit	Vector (Burlingame, USA)
RNeasy® Mini Kit	Qiagen (Hilden)
ThermoScript Reverse Transcriptase	Invitrogen (Karlsruhe)
Vectastain ABC Kit	Vector (Burlingame, USA)

2.1.5 Datenbanken

In Tabelle 3 sind die bei dieser Arbeit verwendeten Datenbanken aufgeführt.

Tabelle 3: verwendete Datenbanken

Name	Internetadresse
Allen Brain Atlas	http://www.brain-map.org
BLAST	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST
BLAT Search	http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat
Electronic PCR	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/e-pcr/
Mouse Genome Informatics (MGI)	http://www.informatics.jax.org
National Center for Biotechnology Information (NCBI)	http://www.ncbi.nlm.nih.gov
Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM)	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=OMIM
PubMed	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=PubMed
UCSC Genome Bioinformatics	http://genome.ucsc.edu

2.1.6 Software

In Tabelle 4 ist die bei dieser Arbeit verwendete Software aufgelistet.

Tabelle 4: verwendete Software

Name	Hersteller
Adobe Illustrator 10	Adobe Systems GmbH (München)
Adobe Photoshop 7.0	Adobe Systems GmbH (München)
Axio Vision Rel. 4.7	Carl Zeiss MicroImaging (Göttingen)
BioEdit 7.0.1	http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html
CorelDRAW 10	Corel (Unterschleißheim)
EndNote	Thomson Reuters (New York, USA)
GraphPad Prism 4.03	GraphPad Prism Software (San Diego, CA/USA)
Bio-Rad iCycler iQ 3.0	Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA/USA)
Microsoft Office 2003	Microsoft Deutschland (Unterschleißheim)
Primer 3 Version 4.0	http://frodo.wi.mit.edu
REST MCS	http://rest.gene-quantification.info

2.1.7 Antikörper

Die bei dieser Arbeit verwendeten Antikörper sind in Tabelle 5 aufgeführt.

Tabelle 5: verwendete Antikörper

Antikörper	Verdünnung Western Blot	Verdünnung Immunhistochemie	Firma
rabbit α -Mct8	1:250	1:500	Atlas
rabbit α -Lat2	1:200	1:50	ImmunoGlobe
rabbit α -Lat1	1:300	1:50	ImmunoGlobe
mouse α -Thyroglobulin		1:750	Thermo Fisher
rabbit α -NIS		1:1200	Acris
mouse α -Gad67		1:2500	Chemicon
mouse α -Tau1		1:200	Chemicon
mouse α -NeuN		1:1000	Millipore
rabbit α -Parvalbumin		1:2000	SWANT
mouse α -Calbindin		1:1000	SWANT
rabbit α -Somatostatin		1:500	Peninsula
rabbit α -Neuropeptid Y		1:5000	Abcam
rabbit α -Calretinin		1:4000	SWANT
rabbit α - β -Aktin	1:2000		Rockland
goat α -rabbit	1:2000		Dako

2.1.8 Mauslinien

Die in dieser Arbeit verwendeten Mauslinien wurden in den Versuchstierhaltungen der Forschungseinrichtungen für Experimentelle Medizin (FEM) der Charité-Universitätsmedizin Berlin nach Vorgaben der lokalen Behörden gezüchtet und gehalten. Alle Tiere erhielten Futter und Wasser ad libitum. Klimabedingungen und Hell-Dunkel-Zyklus (12:12) wurden automatisch kontrolliert.

Zur Untersuchung an primären kortikalen Neuronen wurden trächtige Weibchen in der FEM terminiert verpaart und zum Embryonaltag E15 geliefert. Hierzu wurden Wildtyp-Tiere des Stammes C57Bl/6 verwendet.

Die Mauslinie Mct8-KO wurde von der Firma Deltagen (San Mateo, CA, USA) hergestellt und bezogen. Zur Generierung des Knockout-Allels wurde folgende Sequenz in Exon 2 durch eine LacZ-Neo Kasseette ersetzt: GCTGCCGAATCACAGCCACCACCGGGGCGCTG.

Um unterschiedliche maternale bzw. paternale Effekte auf die Nachkommen zu vermeiden, erfolgte die Zucht der untersuchten Knock-Outs und Wurfkontrollen

immer nach dem gleichen Verpaarungsschema. Ein wt-Männchen wurde mit einem heterozygoten Weibchen verpaart. Aus dieser Verpaarung erhielt man +/y (Wildtyp) und -/y (KO) Männchen, sowie +/+ (Wildtyp) und +/- (heterozygote) Weibchen.

2.2 Methoden

2.2.1 Probengewinnung

Die zu tötenden Mäuse wurden gemäß ihrem Alter nach den Richtlinien des Tierschutzgesetzes getötet. Tiere ab dem Alter von 15 Tagen wurden durch CO₂-Inhalation betäubt und dekapitiert, jüngere Tiere direkt durch Dekapitation getötet. Blut zur Analyse von Serumparametern wurde durch Öffnung des Herzens bzw. der Aorta und anschließendem Sammeln aus dem Thorax gewonnen. Vollblut wurde bis zur Gerinnung auf Eis aufbewahrt und zur Separation des Serums für 10 Minuten bei 10.000 g und 4°C zentrifugiert. Die Lagerung des Serums erfolgte bei -20°C. Organe zur Gewinnung von RNA und Protein wurden präpariert, direkt in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Aufarbeitung bei -80°C gelagert.

Tiere, deren Organe für histologische Untersuchungen vorgesehen waren, wurden wie oben beschrieben getötet. Hierauf erfolgte eine Perfusion mit 0,1 M Phosphatpuffer (PB) pH 7,4 zum Herausspülen des restlichen im Körper befindlichen Blutes sowie die anschließende Perfusion mit 4% Paraformaldehyd in PB (4% PFA) zur Fixierung der Gewebe. Die Organe wurden präpariert und über Nacht in 4% PFA nachfixiert. Organe zur Einbettung in Paraffin wurden maschinell entwässert (Institut f. Pathologie, Charité-Universitätsmedizin Berlin) und in Paraffin eingebettet. Organe für Gefrierschnitte wurden in 30% Rohrzucker in PB kryoprotektiert. Ein vollständiges Durchdringen der Zuckerlösung ließ sich durch ein Herabsinken der Organe in der Zuckerlösung feststellen. Mehrfaches Aufschütteln der Zuckerlösung war nötig. Die kryoprotektierten Organe wurden in 12-well Platten unter pulverisiertem Trockeneis eingefroren und bei -80°C gelagert. Organe, die am Vibratom geschnitten werden sollten, wurden frisch nach der Nachfixierung in 4% Agarose in Wasser eingebettet und am selben Tag auf dem Vibratom geschnitten.

Biopsien lebender Mäuse zur Feststellung des Genotyps wurden bei der Markierung der Tiere mit einer Lochnummerierung im Ohr gewonnen, um zusätzliche Verletzungen der Tiere zu vermeiden.

2.2.2 Probenaufarbeitung

Kleine Organe zur Gewinnung von RNA und Protein wurden direkt in die Extraktionen eingesetzt. Große Organe wurden mit Hilfe eines Dismembrators (B. Braun Biotech International, Melsungen) pulverisiert. Hierzu wurden größere Gewebe zuerst grob in einem auf Trockeneis gekühlten Mörser zerkleinert und anschließend in vorgekühlten Teflongefäßen mit einer gekühlten Wolframkarbidkugel im Dismembrator geschüttelt, bis das Gewebe pulverisiert war. Das Gewebepulver wurde nun mit gekühlten Spateln auf Trockeneis in Reagenzgefäße abgefüllt und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

2.2.2.1 RNA-Isolierung

Die Isolierung von RNA aus kleinen Geweben, wie z.B. primären kortikalen Neuronkulturen oder Schilddrüsen, erfolgte unter Zuhilfenahme des RNeasy® Mini Kits (Qiagen, Hilden). Hierzu wurden die Zellen direkt im Lysepuffer RLT mit 10 µg/ml β-Mercaptoethanol in der Kulturplatte lysiert oder einzelne Schilddrüsenlappen im selben Puffer mit einem Ultra Turrax (IKA, Staufen) homogenisiert. Es folgte ein Zentrifugationsschritt, um restliche feste Bestandteile zu entfernen. Der Überstand wurde nun zur Isolierung der RNA mit einem Volumen 70% Ethanol versetzt und nach Angaben des Herstellers auf die Säulen aufgetragen. Der Durchfluss nach der ersten Zentrifugation wurde zur weiteren Extraktion von Proteinen aufbewahrt. Die an die Säule gebundene RNA wurde nun mehrmals gewaschen und dann mit 30 µl H₂O/DEPC von der Säule eluiert. Das Eluat wurde erneut über die Säule gegeben, um restliche gebundene RNA zu lösen und die Ausbeute und Konzentration an RNA zu erhöhen. Die Konzentration der isolierten RNA wurde mittels photometrischer Messung im NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) bestimmt. Die RNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

2.2.2.2 Proteinextraktion

Zur Extraktion von Proteinen aus primären Neuronkulturen wurden die Zellen direkt in Homogenisationspuffer lysiert. Zur Extraktion aus Geweben der Maus wurde eine Spatelspitze Gewebepulver auf Trockeneis in 250 µl Homogenisationspuffer

aufgenommen und trituriert. Kleine Gewebe wurden direkt in 80 µl Puffer homogenisiert. Hierauf erfolgte der Aufschluss der Zellen mittels Ultraschall (LABSONIC M, Braun Biotech) bei einer Amplitude von 100 und einem Zyklus von 0,6. Das hieraus resultierende Lysat wurde bei geringer Proteinkonzentration als Gesamtprotein eingesetzt. Sofern es möglich war, wurde zur Anreicherung eine partielle Fraktionierung durch Zentrifugation bei 4°C und 13.000 g für 15 Minuten durchgeführt. Dies führte zu einer Anreicherung der Plasmamembranbestandteile im Pellet und der löslichen Bestandteile im Überstand. Dieser Überstand enthält allerdings auch lysosomale und endosomale Proteine. Das Pellet wurde in 150 µl Homogenisationspuffer aufgenommen und mittels Ultraschall resuspendiert. Die Proteinkonzentration wurde wie unter 2.2.4.1 beschrieben bestimmt.

2.2.2.3 Gewinnung von genomischer DNA zur Genotypisierung

Die Nachzucht des Stammes Mct8 wurde aus Biopsien der Ohrlochmarkierung genotypisiert. Hierzu wurden die Biopsien in 50 µl alkalischem Lysepuffer für ca. 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und mehrmals gevortext. Aus dieser Lösung wurde 1 µl direkt in die PCR eingesetzt. Die Gewinnung von genomischer DNA aus Embryonen, welche für primäre kortikale Kulturen benötigt wurden, erfolgte aus Gehirnresten, die bei der Präparation übrig blieben. Diese wurden in 100 µl alkalischem Lysepuffer aufgenommen, nach einer Inkubation von 15-30 Minuten 1:10 mit Lysepuffer verdünnt und hiervon 1 µl in die Genotypisierungs-PCR eingesetzt. Der alkalische Lysepuffer wurde nach den Angaben von Chomczynski et. al hergestellt (Chomczynski and Rymaszewski 2006).

2.2.3 Molekularbiologische Methoden

Die in diesem Kapitel verwendeten Lösungen und Puffer wurden wie in Tabelle 6 beschrieben hergestellt.

Tabelle 6: verwendete Lösungen für molekularbiologische Methoden

Lösung	Zusammensetzung
DEPC-Wasser	0,1 % (w/v) DEPC in dH ₂ O, 24h offen unter dem Abzug inkubieren, danach autoklavieren
DNA-Probenpuffer (6x)	0,25 % (w/v) Bromphenolblau, 30 % (w/v) Glycerin in dH ₂ O
SB-Puffer (1x)	Verdünnung des 20x SB-Puffers in dH ₂ O
SB-Puffer (20x)	8 g NaOH, 45 g Borsäure ad 1l dH ₂ O

2.2.3.1 Genotypisierung mittels PCR

Die Genotypisierung der Mct8-Tiere wurde nach einem optimierten PCR-Protokoll unter Verwendung der von Deltagen angegebenen Primersequenzen in folgendem PCR-Ansatz und nach folgendem Temperaturschema vorgenommen. Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte in einem Etidiumbromid-gefärbten 1,5%igen Agarosegel in SB-Puffer für 20 Minuten bei 260 V. Anhand eines mitgeführten Größenstandards (Generuler 1 kb Plus, Fermentas, Kanada) konnten die Größe der Fragmente überprüft werden. Zur Auswertung wurde das Gel unter UV-Illumination photographiert.

2.2.3.2 Primer

Primer für die semiquantitative Real-Time PCR (qPCR) wurden für jedes Gen selbst ausgewählt. Um eine spezifische Messung der cDNA zu erlauben und mögliche Detektion genomischer DNA zu verhindern, sollten Intron-überspannende Primer angefertigt werden. Hierzu wurden zunächst die Exon-Intron Übergänge der Referenzsequenzen aus NCBI mittels BLAT herausgesucht. Die Sequenz wurde nun in das Programm Primer3 eingegeben und eine Exongrenze als Zielsequenz markiert. Im Suchalgorithmus des Programms konnte die Länge der zu amplifizierenden Sequenz (180-220 bp), die gewünschte Primerlänge (20-23 bp), sowie die optimale Schmelztemperatur (62°C) angegeben werden. Die hieraus resultierenden Primer wurden mittels e-PCR und Blast auf Ihre Spezifität überprüft.

Tabelle 7: verwendete Primer

Maus	Gen	Sequenz	Amplikonlänge
	Slco1a1 fwd	GCAGCTGCTTAACGGACACA	196 bp
	Slco1a1 rev	TTGTCACACTCAGGGCCTTTC	
	Slc10a1 fwd	CCTTGCGCCATAGGGATCTT	185 bp
	Slc10a1 rev	GGCATCAGGGAGGAGGTAGC	
	Slc16a10 fwd	GCCCCATCGTGAGTGTCTTC	182 bp
	Slc16a10 rev	GACCAGTGACGGCTGGTAGG	
	Slc16a2 fwd	CCTCGCTATGGGCATGATCT	202 bp
	Slc16a2 rev	TGGTTGAAAGGCGAATGAGC	
	Slc7a8 fwd	GCCACCCGGGTTCAAGATA	189 bp
	Slc7a8 rev	ATAGGCAAAGGAGCCCTGGA	
	Slc7a5 fwd	GGCCATCATCATCTCCTTGC	197 bp
	Slc7a5 rev	ACCCATTGACAGAGCCGAAG	
	Slco6c1 fwd	CTGTTGCAGAGTGGGTGGTG	193 bp
	Slco6c1 rev	GAAAACCCTTCAAATGAGGTTGA	
	Slco6b1 fwd	TGGGAGGTTTCATTGTTTCCA	219 bp
	Slco6b1 rev	TGGAACGGTCACAACCACAG	
	Slco4c1 fwd	TGGCAAACTTCCCAGACTCA	186 bp
	Slco4c1 rev	AAAAATGTGGCAAATCCCGTA	
	Slco4a1 fwd	TGACCACTGACAGCCCACTG	205 bp
	Slco4a1 rev	TTGCCAAAAGCTGGATTGCT	
	Slco1c1 fwd	AGTGTGGCCGGACTGACTGT	186 bp
	Slco1c1 rev	ACTCCGGCTGGAGGATTGAC	
	Slco1b2 fwd	GCAAGGCACTAGGTGGAGTCA	201 bp
	Slco1b2 rev	CAATGCCCATGATGAAGCAA	
	Slco1a5 fwd	CATCCTGACAAGTGTGCTCCAG	211 bp
	Slco1a5 rev	TGCCATGTATGCAGCCTTCTT	
	Slco1a4 fwd	GGATTCTGGCTATCCCTGACTG	187 bp
	Slco1a4 rev	CTGGGTCCCATGTGTTTCGTT	
	18S fwd	TTGACGGAAGGGCACCACCAG	131 bp
	18S rev	GCACCACCACCCACGGAATCG	
Human	Gen	Sequenz	Amplikonlänge
	SLC10A1 fwd	CAATGTGGGGAAGAGCATCA	199 bp
	SLC10A1 rev	AAAGGCCACATTGAGGATGG	
	SLC16A10 fwd	TTTGTGGGCTCATGTCCAG	203 bp
	SLC16A10 rev	AGCAAAGGCAGCAGGATTGT	
	SLC16A2 fwd	TGCTTTCATTGGCCTCCATA	174 bp
	SLC16A2 rev	CCAGCAGACACCACACCATT	
	SLC7A8 fwd	GTCATCGCCCTCACCTTCTC	202 bp
	SLC7A8 rev	TGATGATAATCAGGGCCAAGG	
	SLC7A5 fwd	CGTGAAGTGTACAGCGTGA	167 bp
	SLC7A5 rev	CATCCAGTTTGGTGCCTTCA	
	SLCO4C1 fwd	TTCTGTGCCACACACAAGTC	158 bp
	SLCO4C1 rev	GCGGATCATCCTCAGTGACA	
	SLCO4A1 fwd	CCGTTCCCATCCTTGTTAC	166 bp
	SLCO4A1 rev	AGCAGGAGCCAGATGGAGAG	
	SLCO1C1 fwd	TCTCTGTTCCGCATGGTGAC	175 bp
	SLCO1C1 rev	TTGCAGCTCCACACACACTG	
	ACTB fwd	AGAGCTACGAGCTGCCTGAC	184 bp
	ACTB rev	AGCACTGTGTTGGCGTACAG	

2.2.3.3 cDNA Synthese

Bei der cDNA-Synthese wurde mit Hilfe einer reversen Transkriptase RNA in cDNA umgeschrieben. Hierzu wurde das Reagenzsystem ThermoScript RT-PCR von Invitrogen, Karlsruhe verwendet. Für jede zu untersuchende Gruppe an Organen bzw. Zellkulturen wurde die gleiche Menge an RNA eingesetzt, mit randomisierten Primern denaturiert und nach folgendem Reaktions- und Temperaturschema in cDNA umgeschrieben.

1 µl	randomisierte Hexamere
2 µl	dNTP Mix
1-5 µg	RNA
ad 12 µl	H ₂ O/DEPC
65°C	5 min
4 µl	5x Puffer
1 µl	0,1 M DTT
1 µl	Rnase OUT
1 µl	H ₂ O/DEPC
1 µl	reverse Transkriptase
je 8 µl zu Proben hinzugeben	
25°C	10 min
50°C	50 min
85°C	5 min
je 1 µl Rnase H hinzufügen	
37°C	20 min

Der anschließende Verdau mit RNase H sollte die als Template eingesetzte RNA abbauen, um eine Detektion in der qPCR zu verhindern. Die cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.2.3.4 qPCR

Die qPCR dient zur quantitativen Detektion von cDNA- bzw. RNA-Mengen und somit zur Bestimmung der Genexpression in bestimmten Geweben. Hierzu wurden die unter 2.2.3.2 erwähnten spezifischen Primer verwendet. Die Quantifizierung erfolgt über den in die DNA interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff SYBR-Green. Die Zunahme der Fluoreszenz pro Zyklus korreliert mit der Zunahme des jeweiligen

PCR-Produktes und somit mit der Anzahl der am Anfang vorhandenen Kopien der cDNA. Das Reagenzsystem für die qPCR wurde von ABgene (Thermo Fisher, Epsom, UK) bezogen und nach folgendem Schema eingesetzt:

12,5 µl	SYBR Green Mix	
0,25 µl	Primer fwd	100 nM
0,25 µl	Primer rev	100 nM
	cDNA	< 250 ng
ad 25 µl	H ₂ O	

Die Amplifikation und Messung erfolgte im iCycler von Bio-Rad Laboratories (München) nach folgendem Protokoll:

95°C	15 min	
95°C	2 min	
95°C	30 sec	
62°C	45 sec	40 x
72°C	30 sec	
72°C	3 min	

Die Software des iCycler ermittelte nun den *cycle of threshold* (ct-Wert), welcher in Bezug zu einem *housekeeping* Gen (18srRNA oder β -Aktin) gesetzt und nach der $2^{\Delta\text{ct}}$ -Methode, $2^{\Delta\Delta\text{ct}}$ -Methode oder mit Hilfe der Software Rest ausgewertet wurde. Zur ersten Überprüfung der benutzten Primer wurde zusätzlich eine Schmelzkurve bestimmt sowie die Größe des amplifizierten Fragmentes in einem Agarose-Gel überprüft.

2.2.4 Proteinbiochemische Methoden

Die in diesem Kapitel verwendeten Lösungen und Puffer wurden wie in Tabelle 8 beschrieben hergestellt.

Tabelle 8: verwendete Lösungen für proteinbiochemische Methoden

Lösung	Zusammensetzung
APS (10 %)	10 % (w/v) APS in dH ₂ O
Blockierungspuffer	5 % (w/v) Magermilchpulver, 0,3 % (w/v) Tween 20 in 1x PBS
Gellösung (20 %)	162,3 ml Acrylamid, 65 ml Bisacrylamid, ad 250 ml dH ₂ O
Homogenisationspuffer	250 mM Saccharose, 20 mM Hepes, 1 mM EDTA in dH ₂ O, pH 7,4
Laemmli-Probenpuffer (4x)	200 mM Tris pH 6,8, 40 % Glycerol, 16 % SDS, 20 % β -Mercaptoethanol, 0,02 % Bromphenolblau in dH ₂ O
Laufpuffer (1x)	Verdünnung des 10x Laufpuffers in dH ₂ O
Laufpuffer (10x)	1,92 M Glycin, 0,25 M Tris, 1 % (w/v) SDS in dH ₂ O
PBS (1x)	Verdünnung 10x PBS in dH ₂ O
PBS (10x)	80 g NaCl, 2 g KCl, 17,8g Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O, 2,5 g KH ₂ PO ₄ in 1 l dH ₂ O, pH 7,4
Ponceau-Rot	0,1 % Ponceau-Rot in 5 % Essigsäure
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris-HCl pH 6,8, 0,4 % (w/v) SDS in dH ₂ O
Transferpuffer (1x)	100 ml 10x Transferpuffer, 100 ml Methanol, ad 1l dH ₂ O
Transferpuffer (10x)	1,92 M Glycin, 0,25 M Tris in dH ₂ O
Trenngelpuffer	1,5 M Tris pH 8,8, 0,4 % (w/v) SDS in dH ₂ O
Waschpuffer	0,03 % Tween 20 in 1x PBS

2.2.4.1 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bradford-Reagenz

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mittels des Bradford-Test. Dieser Test beruht auf der Komplexbildung des Farbstoffes Coomassie-Brillant-Blau G-250 mit Proteinen und der hieraus resultierenden Verschiebung des Absorptionsmaximums von 470 nm zu 595 nm. Die Absorption bei 595 nm ist im Photometer messbar und proportional zur Menge an Protein in der zu messenden Lösung. Mit Hilfe einer Standardreihe eines bovinen IgG-Standards (Bio-Rad Laboratories, München) lässt sich die Konzentration der Proben bestimmen.

2.2.4.2 SDS-Page

Mit Hilfe der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page) wurden Proteine mittels Elektrophorese entsprechend ihrer Größe in einem denaturierenden diskontinuierlichen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Durch die Bindung von Natriumdodecylsulfat (SDS) weisen die Proteine eine einheitliche Ladung auf. Durch Hinzugabe von β -Mercaptoethanol und anschließendes Aufkochen der Proben bei 95°C werden Sekundär- und Tertiärstrukturen des Proteins zerstört. Somit wird

ein strukturabhängiges Laufverhalten des Proteins im Gel verhindert und eine Auftrennung nach der Größe wird möglich.

Zur Auftrennung wurde das diskontinuierliche System nach Laemmli (1970) verwendet. Diese Art der Auftrennung beinhaltet ein Sammelgel und ein Trenngel. Im Sammelgel können sich aufgrund der dort herrschenden Bedingungen Proteine in einem sehr engen Bereich konzentrieren und treten dann in das Trenngel über, wo die eigentliche Separation nach Größen stattfindet. Um die Wanderung der Proteine im Gel verfolgen zu können und ein spezifisches Protein einer Größe zuordnen zu können, wurde ein vorgefärbter Proteinmarker (PageRuler Prestained Protein Ladder, Fermentas, Burlington, Kanada) mitgeführt. In Tabelle 9 ist die Zusammensetzung der verwendeten Gele dargestellt.

Tabelle 9: Zusammensetzung der verwendeten Gele

	Trenngel (12,5 %)	Sammelgel (5 %)
	2 Gele	2 Gele
dH ₂ O	1,25 ml	2 ml
Trenngelpuffer	2,5 ml	-
Sammelgelpuffer	-	1 ml
Gellösung (20 %)	6,25 ml	1 ml
Temed	10 µl	4 µl
APS (10 %)	100 µl	40 µl

2.2.4.3 Western Blot

Der Western Blot ist eine analytische Technik zur immunochemischen Detektion von spezifischen Proteinen, die zuvor mittels SDS-Page aufgetrennt wurden. Im Folgenden werden die einzelnen Schritte beschrieben:

2.2.4.3.1 Transfer

Nachdem die Proteine einer zu untersuchenden Probe nach ihrer Größe im Gel aufgetrennt wurden, erfolgte der Transfer auf eine immobilisierende Nitrocellulosemembran (Whatman, USA). Hierzu wurde das Semi-Dry Verfahren angewandt. Mittels eines angelegten elektrischen Feldes (25V, 500 mA) erfolgt die Übertragung der Proteine aus dem Gel auf die Nitrocellulosemembran. Dies wird durch den Aufbau des Blots gewährleistet. Die Proteine wandern aus dem Gel in Richtung der Anode und verbleiben auf der Nitrocellulosemembran. Dieser Vorgang

dauert ca. 30-45 Minuten. Die gleichmäßige Übertragung der Proteine auf die Membran wurde durch ein reversibles Anfärben der Membran mit Ponceau-Rot überprüft. Die Membran konnte zur Lagerung getrocknet oder direkt für eine immunochemische Detektion eingesetzt werden.

2.2.4.3.2 Immunochemische Detektion

Eine immunochemische Detektion von einzelnen Proteinen auf der Nitrocellulosemembran wurde mittels spezifischer Antikörper durchgeführt. Hierzu wurden zuerst unspezifische Bindungsstellen blockiert, indem die Membran für 45 Minuten in 5% Milchpulver in Waschpuffer (PBST) geschwenkt wurde. Der jeweilige Primärantikörper wurde ebenfalls in Blockierungslösung auf die entsprechende Konzentration verdünnt und die Membran über Nacht bei 4°C mit dem Antikörper inkubiert. Hierauf folgte am nächsten Tag eine weitere Inkubation bei Raumtemperatur für ca. 1 Stunde. Die Membran wurde nun dreimal für 10 Minuten mit PBST geschüttelt. Der Sekundärantikörper ist immer gegen die Spezies gerichtet, in welcher der Primärantikörper hergestellt wurde. Die Verdünnung des Sekundärantikörpers erfolgte ebenfalls in Blockierungslösung. Die Membran wurde 1 Stunde bei Raumtemperatur auf dem Schüttler mit Sekundärantikörper inkubiert. Nun folgten wieder 3 Waschschrte mit PBST. Ein letzter Waschschrte wurde nur in PBS durchgeführt, um eine bessere Aktivität des Detektionsreagenz (ECL) zu gewährleisten. Die Membran wurde für 1 Minute mit ECL inkubiert, in eine Röntgenfilmkassette überführt und mit einem Chemilumineszenz-sensitiven autoradiographischen Film (Hyperfilm ECL (Amersham, USA) detektiert. Die Belichtungszeit des Filmes war je nach Antikörper und eingesetzter Menge an Protein unterschiedlich. Der Film wurde mit dem Entwicklungsgerät X-OMAT 1000 (Kodak Company, Rochester, USA) entwickelt und zur weiteren Bearbeitung eingescannt.

2.2.5 Histologische Methoden

Organe für histologische Untersuchungen wurden wie in den einzelnen Abbildungen vermerkt entweder als Paraffinschnitte, Gefrierschnitte oder Vibratomschnitte genutzt. Dies war abhängig vom Organ, dem Alter der Tiere und der Färbemethode.

Die in diesem Kapitel verwendeten Lösungen und Puffer wurden wie in Tabelle 10 beschrieben hergestellt.

Tabelle 10: verwendete Lösungen für histologische Methoden

Lösung	Zusammensetzung
Acetatpuffer	60 ml Natriumacetatlösung (2,7 %), 240 ml Essigsäure (1,2 %), pH 3,8
Dinatriumhydrogenphosphatlösung (0,2 M)	0,2 M Dinatriumhydrogenphosphat in dH ₂ O
Einfriermedium	30 % (w/v) Glycerol, 30 % (v/v) Polyethylenglykol in 1x PBS
Natriumacetatlösung (2,7%)	27 g Natriumacetat in 1 l dH ₂ O
Natriumdihydrogenphosphatlösung (0,2 M)	0,2 M Natriumdihydrogenphosphat in dH ₂ O
Natriumphosphatpuffer (0,2 M)	80 % (v/v) 0,2 M Dinatriumhydrogenphosphat, 20 % (v/v) 0,2 M Natriumdihydrogenphosphat in dH ₂ O, pH 7,4
PBS (1x)	Verdünnung 10x PBS in dH ₂ O
PBS (10x)	80 g NaCl, 2 g KCl, 17,8g Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O, 2,5 g KH ₂ PO ₄ in 1 l dH ₂ O, pH 7,4
PBST	0,5 % (w/v) Tween in 1 x PBS
Zuckerlösung	30 % (w/v) Saccharose in 0,1 M Natriumphosphatpuffer

2.2.5.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung)

Die HE-Färbung dient als Übersichtsfärbung, um die Morphologie eines Gewebes beurteilen zu können. Hämatoxylin färbt basophile Strukturen blau, Eosin färbt eosinophile Strukturen rot. Hierzu wurden Schnitte zunächst über eine absteigende Alkoholreihe rehydriert, mit Hämatoxylin gefärbt, die Schnitte unter warmem Leitungswasser gebläut und eine Färbung mit Eosin durchgeführt. Anschließend wurden die Schnitte zum Eindecken über eine aufsteigende Ethanolreihe bis in Xylol überführt und aus dem Xylol mit Entellan eingedeckt.

Eine einzelne Färbung mit Hämalaun diente als Gegenfärbung zu Peroxidase-Färbungen eines spezifischen Antikörpers.

In den Tabellen 11 und 12 sind die Zusammensetzungen der Färbelösungen dokumentiert.

Tabelle 11: Zusammensetzung der Hämatoxylin-Lösung

Hämatoxylinlösung	
Mayer's Hämatoxylin (Chroma, Münster)	0,200 % (w/v)
Kalialaun	6,250 % (w/v)
Chloralhydrat	6,250 % (w/v)
Zitronensäure, kristallin	0,125 % (w/v)
NaIO ₃	0,025 % (w/v)

Tabelle 12: Zusammensetzung der Eosinlösung

Eosinlösung	
Eosin Yellowish (Chroma, Münster)	1,25 % (w/v)
EtOH	70,0 % (v/v);
der Lösung wurden direkt vor Gebrauch 4 % (v/v) Eisessig zugesetzt	

2.2.5.2 Peroxidase-Färbung

Immunhistochemische Analysen von Gewebeschnitten erfolgten mit Hilfe des LSAB+ Systems S3022, K3466 und K0690 (Dako, Glostrup, Dänemark) und des Vectastain ABC Kits (Vector, Burlingame, USA). Das unten beschriebene Protokoll gilt generell für beide Färbesysteme. Hierbei konnten sowohl Gefrierschnitte als *free floating* Präparate als auch Paraffinschnitte gefärbt werden. Die Paraffinschnitte mussten hierzu erst über eine Alkoholreihe und Aufkochen in Citratpuffer entparaffiniert werden. Die folgenden Schritte waren für alle Präparate gleich. Zur Blockierung der endogenen Peroxidase wurden die Schnitte mit 0,3 %iger H₂O₂ Lösung inkubiert. Die Schnitte wurden 3 Mal mit 1x PBS gewaschen und zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen mit Blockierungslösung inkubiert. Der primäre Antikörper wurde in dieser Blockierungslösung verdünnt, auf die Schnitte gegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Schnitte wurden erneut gewaschen und für ca. 1 Stunde mit dem biotinylierten Sekundärantikörper bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem erneuten Waschschrift erfolgte die Signalverstärkung durch eine 60-minütige Inkubation mit einem Streptavidin-HRP-Komplex. Nach einem weiteren Waschschrift konnte die Färbung der Schnitte mit dem DAB-Chromogen erfolgen. Die Färbezeit wurde für jeden Antikörper an einem Testschnitt unter dem Mikroskop beurteilt und die Färbung entsprechend für die restlichen Schnitte durchgeführt, um vergleichbare Resultate zu erzielen. *Free Floating* Schnitte wurden auf Objektträger aufgezogen

und ebenso wie Paraffinschnitte nach einer aufsteigenden Alkoholreihe aus Xylol mit Entellan eingedeckt.

2.2.5.3 Fluoreszenz-Färbung

Immuncytochemische Färbungen mit fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpern dienten zur gleichzeitigen Detektion von zwei Proteinen im selben Präparat. Hierzu wurde das Reagenzsystem M.O.M.-Kit (Vector, Burlingame, USA) eingesetzt. Es wurde gleichzeitig mit 2 Primärantikörpern und 2 unterschiedlich markierten, der Spezies der Primärantikörper entsprechenden Sekundärantikörpern gearbeitet. Die Primärantikörper mussten in verschiedenen Spezies generiert worden sein, um eine parallele Detektion zu ermöglichen. Hierzu wurden Antikörper aus der Spezies Maus und Kaninchen eingesetzt. Zuerst wurden unspezifische Bindungsstellen mit Blockierungslösung abgesättigt. Die Schnitte wurden dreimal für 5 Minuten mit 1x PBS gewaschen und mit verdünntem Primärantikörper über Nacht bei 4°C inkubiert. Auf einen erneuten Waschschrift erfolgte die direkte Detektion mit zwei unterschiedlich markierten fluoreszierenden Sekundärantikörpern für 45 Minuten bei Raumtemperatur. Eine Gegenfärbung mit dem fluoreszierenden DAPI ermöglichte eine Färbung aller Zellkerne. Die Präparate wurden mit ImmuMount (Shandon, USA) eingedeckt.

2.2.6 Humane Proben

2.2.6.1 Western Blot

Eine Nitrocellulosemembran mit Proteinextrakten von verschiedenen humanen Geweben wurde zur Untersuchung mittels Western Blot von der BioCat, Heidelberg bezogen. Auf der Membran immobilisiert waren jeweils 40 µg Protein aus einer partiellen Membranfraktionierung.

2.2.6.2 Histologische Präparate

Paraffinschnitte von humanen Embryonen und Nieren wurden aus dem Autopsiematerialarchiv des Instituts für Neuropathologie, Charité Universitätsmedizin

Berlin, von Frau Dr. Blechschmidt und Herrn Prof. Heppner zur Verfügung gestellt und mit ausgewertet. Embryonen der folgenden Schwangerschaftswochen (GW *gestational week*) wurden gefärbt und ausgewertet: GW 13, GW 16, GW17, GW 18, GW 22, GW 23, GW 25 GW 26, GW 32, GW 35, GW 37 und GW 40.

2.2.7 Statistik

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mittels GraphPad Prism 4.0 mit dem in der jeweiligen Abbildungslegende angegebenen Test. Die Fehlerbalken aller Diagramme sind, soweit nicht gesondert angegeben, als Standardfehler des Mittelwertes (SEM) dargestellt.

3. Ergebnisse

3.1 Expression von Mct8 in verschiedenen Geweben

Schilddrüsenhormone werden in verschiedenen Geweben und Organen sowohl während der Entwicklung als auch zu späteren Zeitpunkten benötigt. Um den Transport von Schilddrüsenhormonen vom Blut in Gewebe und zwischen Zellen zu ermöglichen, werden Schilddrüsenhormontransporter benötigt. Eine Übersicht über die Expression von Mct8 in verschiedenen Geweben der Maus und des Menschen soll in den nächsten Abbildungen gegeben werden.

3.1.1 Expression von Mct8 während der Entwicklung

Die Expression von Mct8 wurde mittels Western Blot zu den Entwicklungszeitpunkten Embryonaltag (E) 15, E17 und Postnaltag (P) 2 der C57Bl/6 Maus in Leber, Niere, Gehirn, Rückenmark, Lunge, Herz und Gastrointestinaltrakt untersucht. Alle untersuchten Gewebe wiesen eine Expression von Mct8 auf (Abb. 5). Leber, Niere, Gehirn und Rückenmark änderten die Expressionsstärke während der Entwicklung nicht. In der Lunge hingegen war zum Zeitpunkt E15 und E17 eine relativ geringe Expression gegenüber anderen Geweben zu sehen. Zum Zeitpunkt P2 steigerte sich diese jedoch deutlich. Die Expression in Herz und Gastrointestinaltrakt verhielt sich indes gegenläufig hierzu: die Expression nahm mit zunehmendem Alter ab.

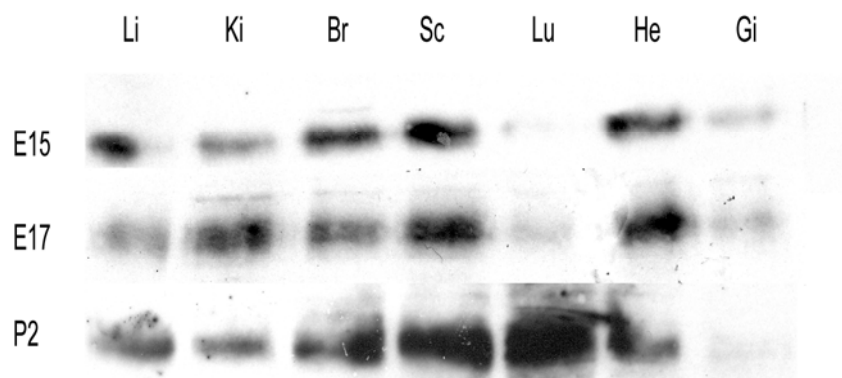


Abbildung 5: Entwicklungsabhängige Expression von Mct8

Die Expression von Mct8 in verschiedenen Geweben der Maus ist abhängig vom Entwicklungsstadium. Western Blot der Entwicklungsstadien Embryonaltag (E) 15, E17 und Postnaltag (P) 2. Leber (Li), Niere (Ki), Gehirn (Br), Rückenmark (Sc), Lunge (Lu), Herz (He), Gastrointestinaltrakt (Gi).

Ebenso wurden primäre kortikale Neurone zu verschiedenen Zeitpunkten (4-13 Tage Kulturdauer) und unter Kultivierungsbedingungen mit verschiedenen Jodothyroninen auf die Expression von Mct8 hin untersucht. Nach kurzer Kultivierungsdauer von 4 Tagen war nur eine geringe Menge an Mct8 detektierbar (Abb. 6A). Diese nahm jedoch mit längerer Kultivierungsdauer der Zellen zu. Ab Kultivierungstag 10 war es zudem möglich mehrere Banden für Mct8 aufzutrennen. Die Kultivierung der Zellen mit verschiedenen Jodothyroninen hatte keinen Effekt auf die Expression des Transporters (Abb. 6B). Auch hier konnten mehrere Banden für Mct8 beobachtet werden. Diese augenscheinliche Proteinmodifikation wurde nur in Neuronen und Gehirn beobachtet. Eine erhöhte Mobilität deutet aber entweder auf proteolytische Verkürzung oder auf Erhöhung der negativen Ladung hin. Viele intrazelluläre Serinreste könnten potenziell phosphoryliert werden, dies wurde jedoch bisher nicht weiter untersucht.

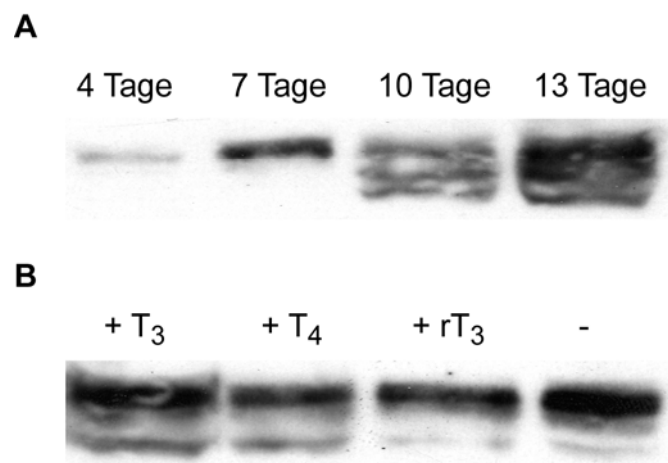


Abbildung 6: Akkumulation von Mct8 in kultivierten kortikalen Neuronen

Die Expression von Mct8 in kultivierten kortikalen Neuronen steigert sich mit der Dauer der Kultivierung. Die Zugabe von verschiedenen Jodothyroninen (je 10 nM) hat keinen deutlichen Einfluss auf die Expression von Mct8.

3.1.2 Expression von Mct8 in der adulten Maus

Zur Untersuchung der Expression in verschiedenen Geweben der adulten Maus wurde ein *multiple tissue blot* mit folgenden Geweben angefertigt: Leber, Niere, Milz, Nebenniere, Herz, Lunge, Skelettmuskel, Testes, Ovar, Gehirn, Rückenmark, Hypophyse, Schilddrüse, Dickdarm, Dünndarm, Pankreas, braunes Fettgewebe, weißes Fettgewebe, Auge und Thymus. Eine starke Expression von Mct8 wurde in Leber, Niere, Hypophyse und Schilddrüse detektiert. Gehirn, Nebenniere, Ovar und

Rückenmark zeigten eine geringere, aber doch deutliche Expression, wohingegen Milz, Lunge, Testes, weißes Fettgewebe und Auge eine sehr schwache Expression zeigten. In den restlichen Geweben konnte kein Mct8 detektiert werden (Abb. 7A).

3.1.3 Expression von Mct8 in adulten humanen Geweben

Um einen Vergleich und eine Diskussion des Mct8-KO Mausmodells mit humanen Allan-Herndon-Dudley-Patienten zu ermöglichen, wurden verschiedene humane adulte Gewebe auf die Expression von Mct8 hin untersucht. Gehirn, Hypophyse, Leber, Testes und Schilddrüse zeigten eine starke Expression des Transporters. Herz, Plazenta und Milz eine geringe, gerade noch detektierbare Expression (Abb. 7B).

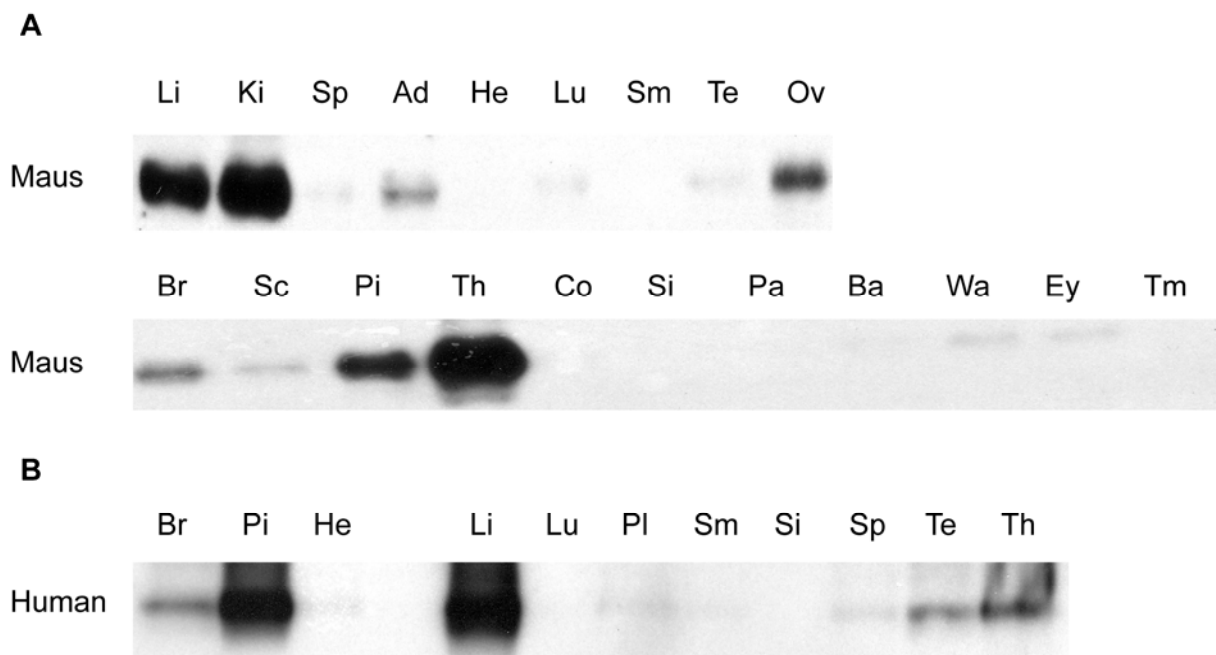


Abbildung 7: Mct8 in adulten Geweben

Mct8 ist in verschiedenen adulten Geweben der Maus (A) und des Menschen (B) exprimiert. Bis auf die Expression im menschlichen Herz, die bei der Maus nicht vorhanden ist, ist das Expressionsmuster in murinem und humanem Gewebe gleich. Leber (Li), Niere (Ki), Milz (Sp), Nebenniere (Ad), Herz (He), Lunge (Lu), Skelettmuskel (Sm), Testes (Te), Ovar (Ov), Gehirn (Br), Rückenmark (Sc), Hypophyse (Pi), Schilddrüse (Th), Dickdarm (Co), Dünndarm (Si), Pankreas (Pa), braunes Fettgewebe (Ba), weißes Fettgewebe (Wa), Auge (Ey) und Thymus (Tm), Plazenta (Pl).

3.2 Phänotypische Charakterisierung der *Mct8*-defizienten Maus

Die *Mct8*-defiziente Maus soll als Tiermodell die Möglichkeit bieten, Erklärungen und Mechanismen für das durch Mutationen in *Mct8* ausgelöste Allan-Herndon-Dudley-Syndrom beim Menschen zu finden. Hierzu wurde das Mausmodell detailliert charakterisiert. Eine umfassende Beschreibung von verschiedensten Merkmalen wurde hierbei durch ein komplettes Untersuchungsprogramm zur Phänotypisierung der Mauslinie in der *German Mouse Clinic* machbar. Diese standardisierte Methode bot die Möglichkeit einer großflächigen Beschreibung verschiedenster Gebiete. Neben diesen Tests wurden weitere Methoden angewendet, um Aufschluss über den genauen Phänotyp bzw. Möglichkeiten zum Vergleich mit dem humanen Phänotyp zu bieten.

3.2.1 Allgemeine Beschreibung

Die *Mct8*-defiziente Maus wurde von der Firma Deltagen wie unter Abb. 8A beschrieben hergestellt und auf den Stammhintergrund C57Bl/6 für mehr als zehn Generationen rückgekreuzt. Anhand von äußerlichen Merkmalen war kein Unterschied zwischen Wurfgeschwistern des Genotyps *Mct8*^{+/y} und *Mct8*^{-/y} erkennbar (Abb. 8B). Mittels einer Genotypisierung wie unter 2.2.3.1 beschrieben ließen sich die einzelnen Genotypen jedoch deutlich identifizieren (Abb. 8C).

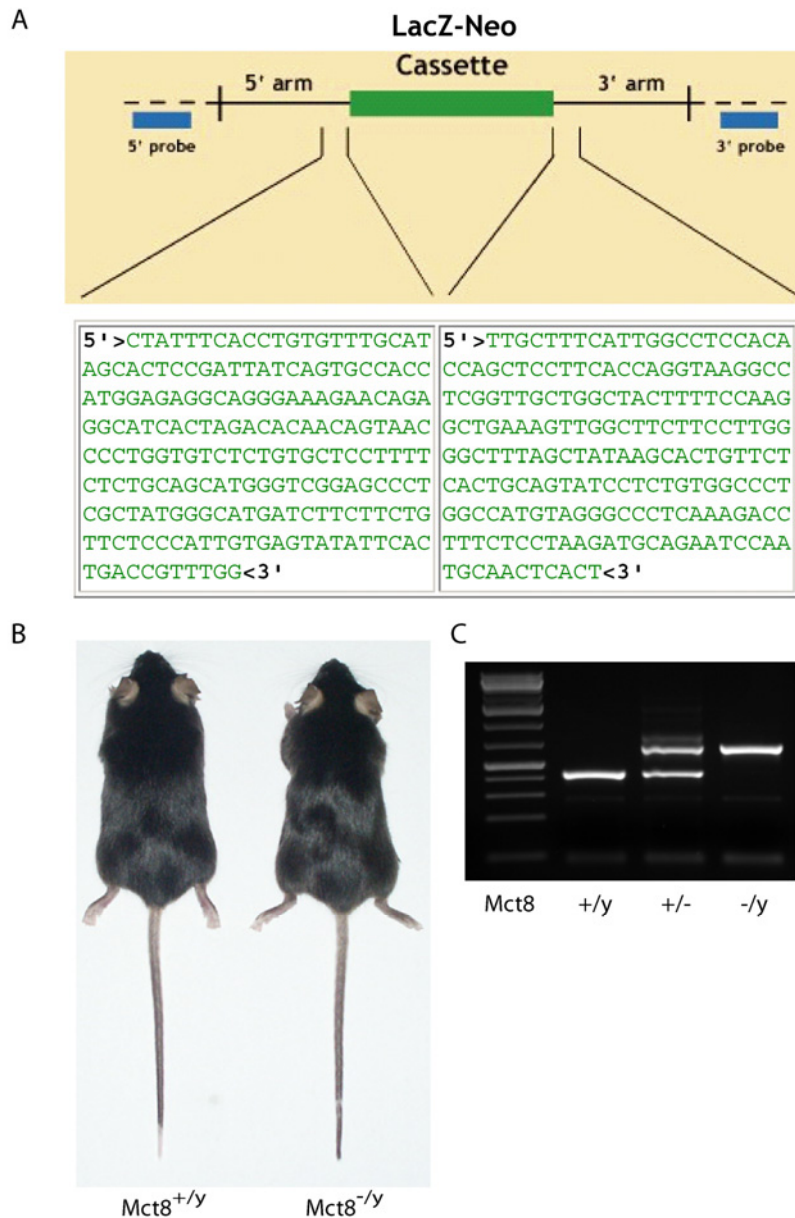


Abbildung 8: Die *Mct8*-defiziente Maus

Mct8-defiziente Mäuse wurden mit Hilfe des unter (A) dargestellten Konstruktes von der Firma Deltagen hergestellt. Äußerlich ließen sich keine Unterschiede zwischen $Mct8^{+/y}$ und $Mct8^{-/y}$ Mäusen erkennen (B). Die Genotypisierung der Mäuse ergab eine Bande der Größe 411 bp für den Wildtyp und eine Bande der Größe 639 bp für den Knock-out (C).

Um die $Mct8^{-/y}$ Maus als Modell für das Allan-Herndon-Dudley-Syndrom zu etablieren, wurde ein prominentes Merkmal dieses Syndroms, die gestörten Werte der Schilddrüsenhormone T_4 und T_3 sowie des TSH, im Serum untersucht. Für diese Untersuchung wurden nur männliche Tiere der Genotypen $Mct8^{+/y}$ und $Mct8^{-/y}$ einbezogen. Die Ergebnisse zeigten signifikant erhöhte T_3 -Werte, signifikant erniedrigte T_4 -Werte und ebenfalls signifikant erhöhte TSH-Werte in den *Mct8*-

defizienten Mäusen (Abb. 9). Hiermit konnte eine Replikation des humanen Phänotyps belegt werden.

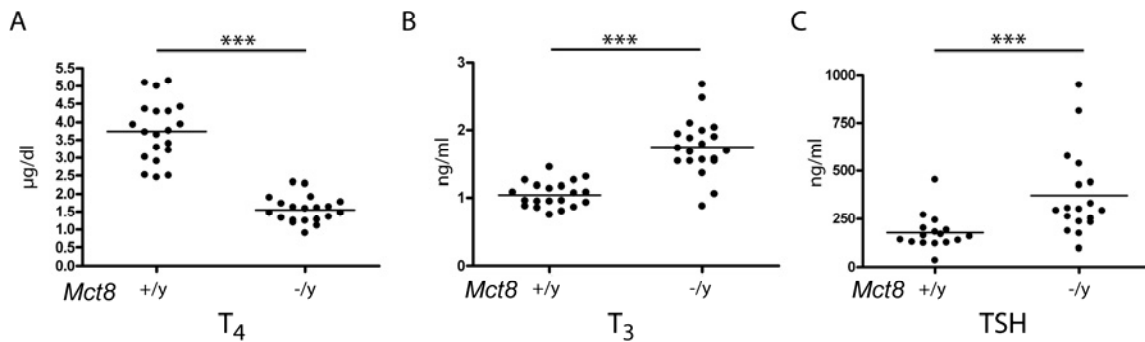


Abbildung 9: Schilddrüsenhormonwerte bei Mct8^{+/y} und Mct8^{-/y} Mäusen

Die Schilddrüsenhormonwerte von Mct8^{+/y} und Mct8^{-/y} Mäusen wurden bei jeweils 20 Tieren beider Genotypen bestimmt. Mct8^{-/y} Mäuse zeigten signifikant erhöhte T₃-Werte (A), bei signifikant erniedrigten T₄-Werten (B) und einem signifikant erhöhten TSH (C). *** p<0,001; Mann-Whitney-Test.

Signifikant veränderte Schilddrüsenhormonparameter führen oft zu einhergehenden Änderungen des Körpergewichtes. Eine Analyse des Körpergewichtes von Mct8^{+/y} und Mct8^{-/y} Tieren in verschiedenen Altersgruppen (< 6 Monate, 6 Monate – 1 Jahr, > 1 Jahr) zeigte, dass Mct8^{-/y} Mäuse mit zunehmendem Alter tendenziell leichter sind als Mct8^{+/y} Mäuse. In der Gruppe der Tiere, die älter als ein Jahr waren, wurde diese Tendenz signifikant (Abb. 10). Gewichtsmessungen, die zu verschiedenen Zeitpunkten in der *German Mouse Clinic* durchgeführt wurden, zeigten die gleichen Tendenzen wie die exemplarisch dargestellten Daten.

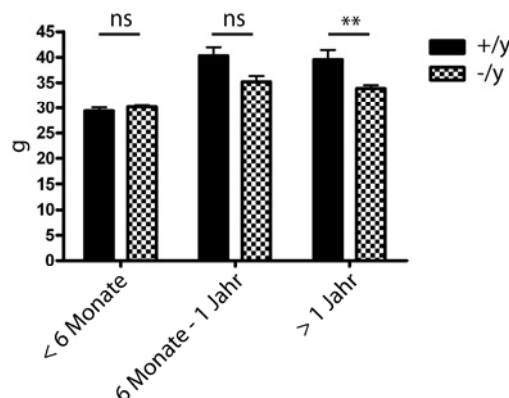


Abbildung 10: Körpergewicht bei Mct8^{+/y} und Mct8^{-/y} Mäusen

Die Messung des Körpergewichtes zeigte einen mit zunehmendem Alter deutlich werdenden Unterschied zwischen Mct8^{+/y} und Mct8^{-/y} Mäusen. Mct8^{-/y} Mäusen wiesen ein geringeres Körpergewicht auf als ihre Wurfgeschwister (n=4-33). Nicht signifikant (ns), ** p<0,01; ANOVA mit Bonferroni-Test.

3.2.2 Hör- und Sehfähigkeit

Bei einer Hypothyreose während der Entwicklung kommt es oft zu Taubheit durch Schädigungen der inneren Haarzellen im Ohr sowie zu verändertem Sehverhalten durch eine Störung der Retinaentwicklung. Die Hörfähigkeit der Mäuse wurde in der *German Mouse Clinic* mittels eines Clickbox-Tests bei 10 $Mct8^{+/y}$ und 11 $Mct8^{-/y}$ Tieren im Alter von 16 Wochen untersucht. Die $Mct8$ -defizienten Mäuse wiesen keine Unterschiede im Gehör zu ihren Wurfgeschwistern auf. Die Tiere zeigten somit ein normales Verhalten in diesem Test (Tab. 13). Generell ist jedoch erkennbar und bereits bekannt, dass Tiere auf dem Stammhintergrund C57Bl/6 mit zunehmendem Alter schlechter hören.

Tabelle 13: Clickbox-Test

Punktzahl	+/y	-/y
0	1	3
1	0	0
2	4	6
3	4	2
4	1	0
5	0	0
durchschnittliche Punkte	2,4	1,64

Die Untersuchung der Hörfähigkeit mit Hilfe des Clickbox-Tests zeigte keine genotypspezifischen Unterschiede zwischen $Mct8^{+/y}$ und $Mct8^{-/y}$ Mäusen. ANOVA mit Kruskal-Wallis Test

Die Sehfähigkeit der Tiere wurde mittels Funduskopie, Schlitzlampen-Mikroskopie und Laser-Interferenz-Biometrie untersucht. Hierzu wurden 9 $Mct8^{+/y}$ und 10 $Mct8^{-/y}$ Tiere im Alter von 18 Wochen untersucht. Es konnten keine abnormen Veränderungen des anterioren Segmentes (alle ohne Befund), des Augenhintergrundes ($Mct8^{+/y}$: 7 ohne Befund, 2 gepunktet; $Mct8^{-/y}$: 10 ohne Befund), sowie der axialen Augenlänge ($3,68 \pm 0,009$ mm gegen $3,663 \pm 0,012$ mm) und der axialen Augenlänge bezogen auf die Körperlänge der Mäuse ($0,036 \pm 0,0002$ gegen $0,037 \pm 0,0002$) festgestellt werden. Somit haben die veränderten Schilddrüsenhormonwerte der $Mct8$ -defizienten Tiere keinen Einfluss auf die Entwicklung des Gehörs und des Auges.

3.2.3 Hämatologische Untersuchung

Des Weiteren wurden 10 Mct8^{+/-} und 10 Mct8^{-/-} Tiere im Alter von 20 Wochen einer hämatologischen Untersuchung unterzogen. Hierbei wurde die Zahl der Leukozyten (*white blood cell count*-WBC) und Erythrozyten (*red blood cell count*-RBC), der Hämatokrit- (HCT) und Hämoglobinwert (HGB), mittleres Erythrozyteneinzelvolumen (*mean corpuscular volume*-MCV), mittleres korpuskuläres Hämoglobin (*mean corpuscular hemoglobin*-MCH), mittlere korpuskuläre Hämoglobinkonzentration (*mean corpuscular hemoglobin concentration*-MCHC), Erythrozytenverteilungsbreite (*red blood cell distribution width*-RDW), Thrombozytenzahl (*platelet count*-PLT) und mittleres Thrombozytenvolumen (*mean platelet volume*-MPV) bestimmt. Es konnten bei dieser Untersuchung keine Unterschiede zwischen Mct8^{+/-} und Mct8^{-/-} Tieren nachgewiesen werden (Tab. 14).

Tabelle 14: hämatologische Untersuchung

	+/-	-/-	
WBC (10 ³ /µl)	8,2 ± 1,06	7,2 ± 0,38	ns
RBC (10 ⁶ /µl)	9,9 ± 0,13	10 ± 0,08	ns
HCT (%)	49,3 ± 0,61	49,2 ± 0,62	ns
HGB (g/dl)	15,2 ± 0,19	15,3 ± 0,15	ns
MCV (fl)	49,8 ± 0,36	49,5 ± 0,62	ns
MCH (pg)	15,3 ± 0,08	15,3 ± 0,1	ns
MCHC (g/dl)	30,8 ± 0,14	31 ± 0,28	ns
RDW (% of MCV)	14 ± 0,22	14,7 ± 0,32	ns
PLT (10 ³ /µl)	848 ± 66,9	861 ± 47,7	ns
MPV (fl)	5,75 ± 0,24	5,6 ± 0,15	ns

Die Untersuchung des Blutes von Mct8^{+/-} und Mct8^{-/-} Mäusen zeigte keinen Unterschied. Nicht signifikant (ns); ANOVA .

3.2.4 Muskelfunktion

Ein prominentes, äußerlich gut erkennbares Merkmal bei Patienten mit Mutationen im Monocarboxylattransporter 8 ist eine deutliche Muskelschwäche. Dies ist bei Mct8-defizienten Mäusen äußerlich nicht erkennbar. Um dies zu belegen wurde eine Messung der Muskelfunktion durch den *forelimb grip strength* Test durchgeführt. Wie bereits vermutet zeigten Mct8-defiziente Mäuse keine verminderte Muskelfunktion (Abb. 11).

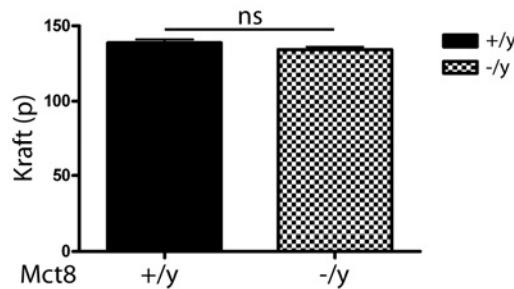


Abbildung 11: forelimb grip strength-Test

Eine Messung der Muskelfunktion mit Hilfe des *forelimb grip strength*-Tests ergab keinen Unterschied zwischen Mct8^{+/y} und Mct8^{-/y} Mäusen (n=10-11). Nicht signifikant (ns); t-Test.

3.2.5 Gehirn und Nervensystem

Der Schilddrüsenhormontransporter Mct8 ist, wie bereits durch Western Blots gezeigt wurde, während verschiedener Stadien der Entwicklung sowie im erwachsenen Tier im Gehirn exprimiert. Mittels immunhistochemischer Untersuchungen wollten wir nun eine genauere Verteilung des Transporters im Gehirn beleuchten. Mct8 konnte bereits zum Postnataltag 5 sehr deutlich in Neuronen detektiert werden. Im adulten Tier wurden verschiedene Gehirnnareale mit Expression von Mct8 dargestellt. Hierzu konnten zum Vergleich die gleichen Bereiche im Gehirn der *Mct8*-defizienten Maus gezeigt werden (Abb. 12). Eine deutliche membranständige Färbung von Neuronen ist im Kortex erkennbar. Diese Färbung ist im Mct8^{-/y} Tier nicht vorhanden (Abb. 12a). Des Weiteren war im Hippocampus und Gyrus dentatus eine sehr distinkte Färbung zu erkennen, mit einer stärkeren Färbung der Molekularschicht und einer schwach gefärbten Körnerzellschicht im Gyrus dentatus (Abb. 12b). In einer vergrößerten Darstellung der CA3 Region sieht man auch hier eine Membranfärbung von Neuronen, die im Mct8^{-/y} Neuron nicht vorhanden ist (Abb. 12c). Ein ebenso sehr prominenter Ort mit sehr spezifischer Mct8-Färbung war der Plexus Choroideus. Hier konnte man bereits zum Embryonaltag 15 eine apikale, zum CSF hin ausgerichtete Färbung von Mct8 erkennen, welche ebenso im adulten Tier vorhanden ist, jedoch nicht in der *Mct8*-defizienten Maus (Abb. 12d). Es konnte auch eine Färbung in Purkinje-Zellen (pc) im Kleinhirn gefunden werden sowie verschiedene Interneurone: Sternzellen (Pfeil) und Golgizellen (Sternchen) (Abb. 12e). Zuletzt soll hier noch ein Bereich mit einem sehr speziellen Zelltyp erwähnt werden, der sich ebenfalls als Mct8-positiv erwiesen hat: die Tanocyten im dritten Ventrikel. Man kann sehr deutlich

die radialen Fortsätze zum Hypothalamus (weißer Pfeil) sowie die Auskleidung des dritten Ventrikels erkennen (schwarzer Pfeil) (Abb. 12f). Auch hier war in der *Mct8*-defizienten Maus keine Färbung zu erkennen. Im adulten Tier ist die Färbung einzelner *Mct8*-positiver Zellen aufgrund der hohen Expression von *Mct8* kaum mehr zu erkennen. Am Postnataltag 5 hingegen waren einzelne *Mct8*-positive Zellen gut zu identifizieren (Abb. 12g-j).

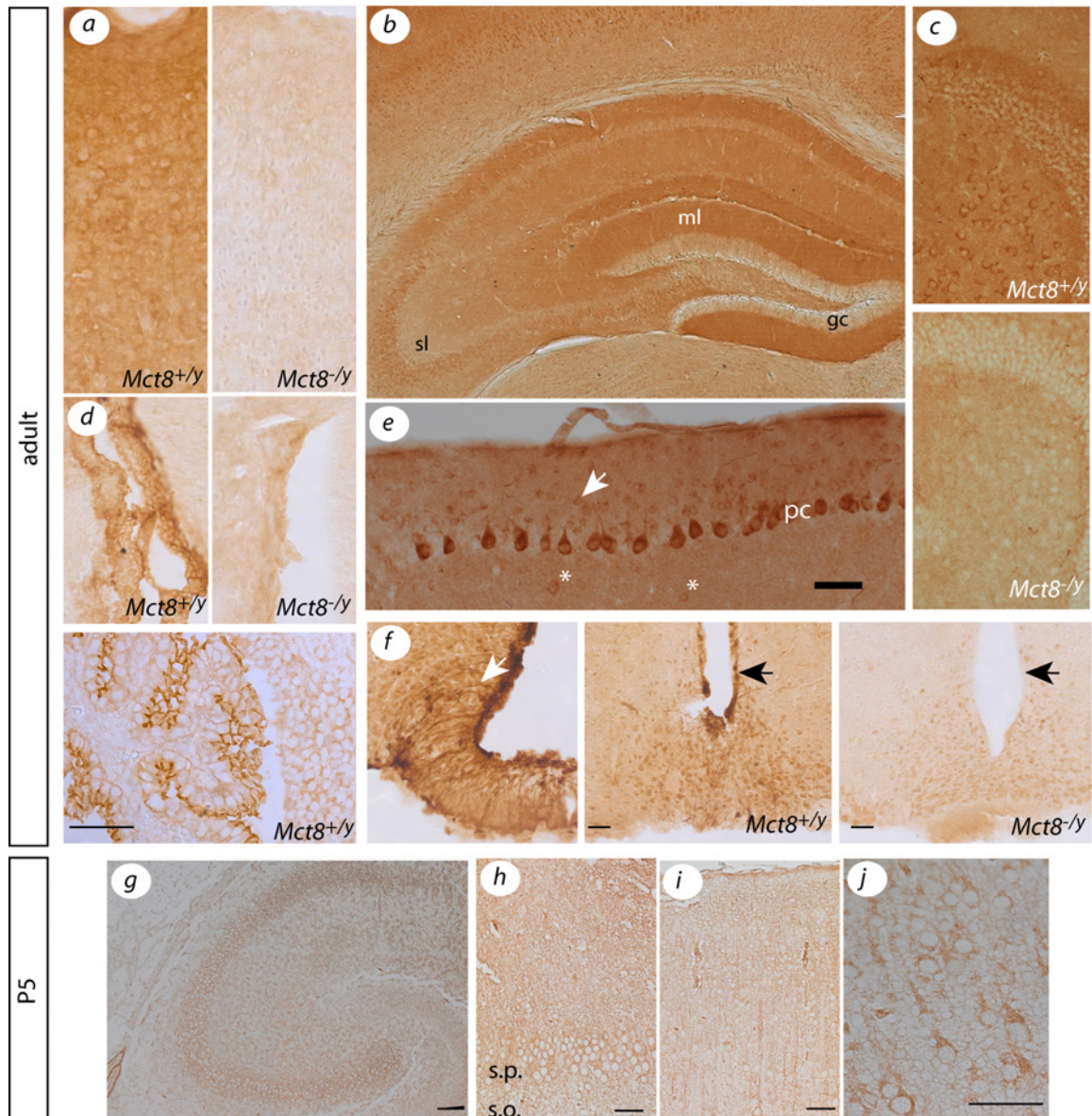


Abbildung 12: Expression von *Mct8* in murinem Gehirn

Immunohistochemische Färbung von *Mct8* in verschiedenen Gehirninregionen im Vergleich zu *Mct8*^{-/-} Mäusen. a: Cerebraler Kortex. b: Hippocampus. c: Gyrus dentatus mit Hilus. d: Plexus Choroideus, untere Abbildung E15. e: Cerebellärer Kortex. Maßstabsbalken 50µm. f: Hypothalamus. g: Hippocampus P5. Maßstabsbalken 100µm. h: CA3 Region vergrößert von g. s.p., Stratum pyramidale; s.o., Stratum oriens. i, Somatosensorischer Kortex P5. j: Vergrößerung von i: Maßstabsbalken h-j 50µm.

Um mögliche strukturelle Veränderungen des Gehirns, die durch eine gestörte Entwicklung aufgrund des Fehlens von Schilddrüsenhormonen in Neuronen aufgetreten sein könnten, zu untersuchen, wurde ein immunhistochemischer Vergleich von *Mct8*-defizienten Tieren und ihren Wurfgeschwistern unternommen. Coronale Gehirnschnitte aus vergleichbaren Ebenen wurden mit Antikörpern gefärbt, die einen Überblick über verschiedene Zelltypen und deren Anordnung im Gehirn geben können. Es konnten keine Unterschiede zwischen der Gehirnmorphologie von *Mct8*-defizienten und wt Mäusen aufgedeckt werden. Exemplarisch werden hier Antikörperfärbungen gegen NeuN, Parvalbumin, Calbindin, Somatostatin, NPY und Calretinin im somatosensorischen Barreliercortex sowie Färbungen gegen NeuN, Parvalbumin und Calbindin im Hippocampus gezeigt (Abb. 13a und b). Weitere Färbungen mit Antikörpern gegen ACHE, ChAT, p75 und MAP-2 wiesen ebenfalls auf keinerlei morphologische Veränderung des Gehirns von *Mct8*^{-/-} Tieren hin (Daten nicht gezeigt).

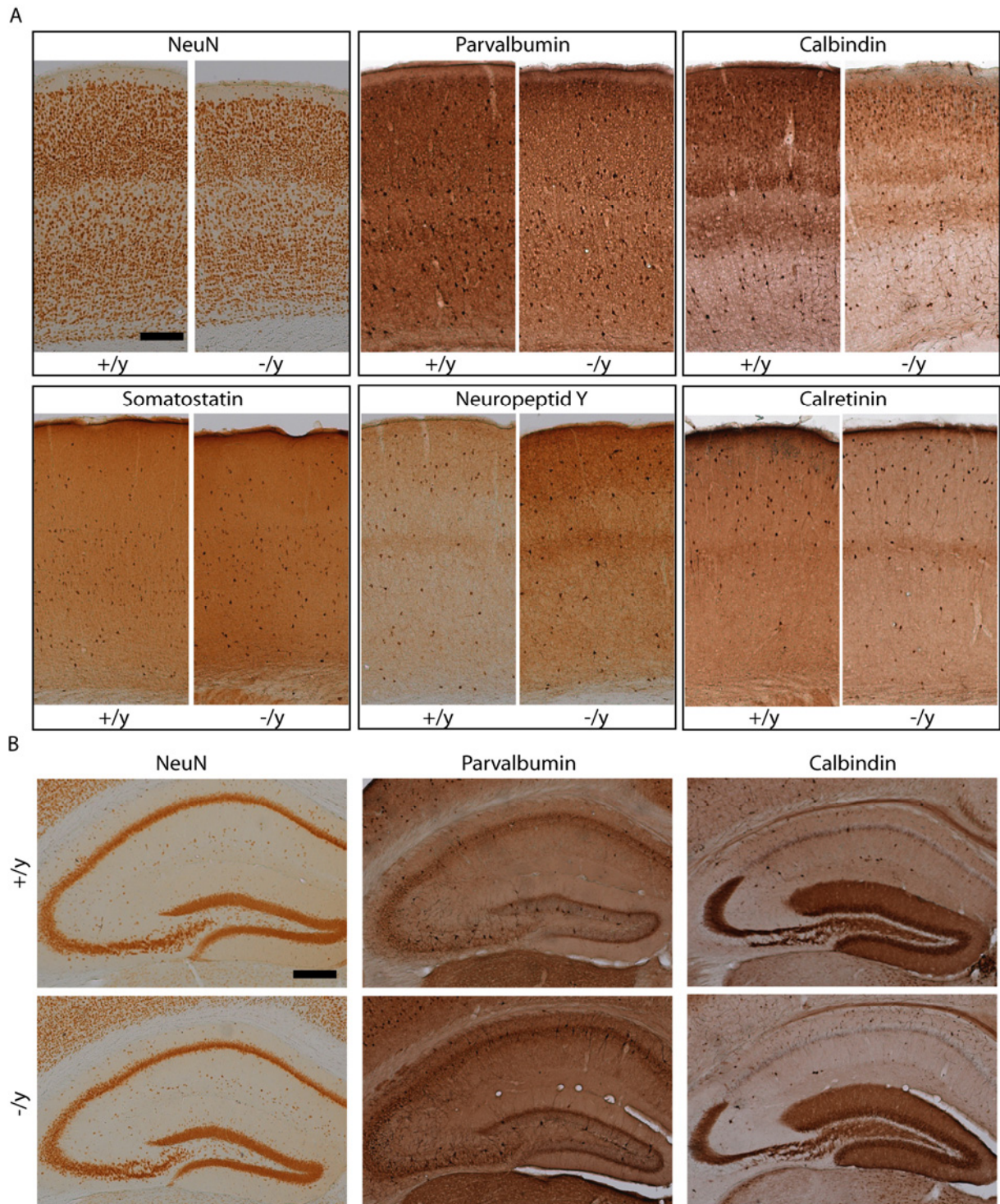


Abbildung 13: Morphologischer Vergleich zwischen Gehirnen von $Mct8^{+/y}$ und $Mct8^{-/y}$ Mäusen

Strukturelle Veränderungen von $Mct8^{-/y}$ Gehirnen wurden mit Hilfe immunhistochemischer Färbungen unterschiedlicher Gehirnregionen untersucht. Färbungen mit Antikörpern gegen NeuN, Parvalbumin, Calbindin, Somatostatin, NPY und Calretinin zeigten keine Unterschiede im somatosensorischen Barreldfeld-Cortex (A). Färbungen des Hippocampus mit Antikörpern gegen NeuN, Parvalbumin und Calbindin zeigten ebenfalls keinen morphologischen Unterschied (B). Maßstabsbalken 200 μm .

Färbungen in primären Kulturen von kortikalen Neuronen zeigten ebenfalls eine deutliche Expression von Mct8. Mittels Fluoreszenzdoppelfärbungen von Neuronen mit Mct8 und NeuN konnte eindeutig belegt werden, dass es sich bei den gefärbten Zellen um Neurone handelt und Mct8 somit in diesen exprimiert wird. Eine Doppelfärbung mit GAD67 zeigte Zellen welche für beide positiv sind, aber auch Zellen, die nur mit GAD67 anzufärben waren. Da GAD67 ein Markerprotein von Interneuronen ist, scheint ein Teil derselben auch Mct8 zu exprimieren. Eine Doppelfärbung mit Tau zeigte eine Lokalisation von Mct8 im Axon (positive Doppelfärbung) sowie in Dendriten von Neuronen (nur Färbung mit Mct8) (Abb. 14).

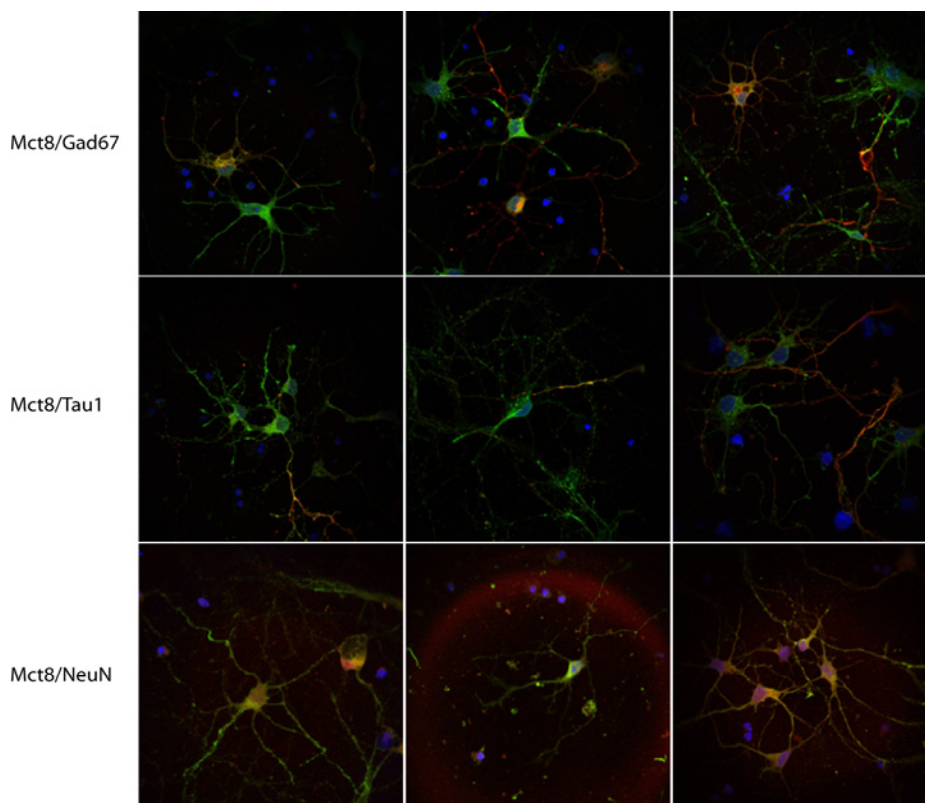


Abbildung 14: Expression und Lokalisation von Mct8 in kortikalen Neuronen

Kultivierte Neurone wurden mit Antikörpern gegen Mct8 (grün) und GAD67 (rot) als Markerprotein für Interneurone, Tau1 (rot) als Markerprotein für Axone und NeuN (rot) als Markerprotein für Neurone doppelfärbt. Eine Gegenfärbung mit DAPI (blau) zeigt alle Zellkerne.

Da die morphologischen Untersuchungen der Gehirne von *Mct8*-defizienten Mäusen keine Veränderungen zeigten, wurden in Zusammenarbeit mit der *German Mouse Clinic* verschiedene Verhaltenstests durchgeführt, um vielleicht auf diese Weise Anhaltspunkte für Störungen der Gehirnentwicklung zu finden. Das Bewegungsverhalten der *Mct8*^{-/-} Tiere wurde jeweils im Vergleich zu Wurfgeschwistern im *Open Field Test* und im *Rotarod-Test* dokumentiert. Untersucht wurden 15 *Mct8*^{+/-} und 15

Mct8^{-/-} Tiere im Alter von 17 Wochen. Im *Open Field Test* ergab sich kein Unterschied zwischen beiden Gruppen hinsichtlich der gesamten zurückgelegten Distanz (Abb. 15A) und der mittleren Bewegungsgeschwindigkeit (Abb. 15B). Der *Rotarod-Test* zeigte ebenfalls keinen Unterschied zwischen Mct8^{+/-} und Mct8^{-/-} Mäusen (Abb. 15C).

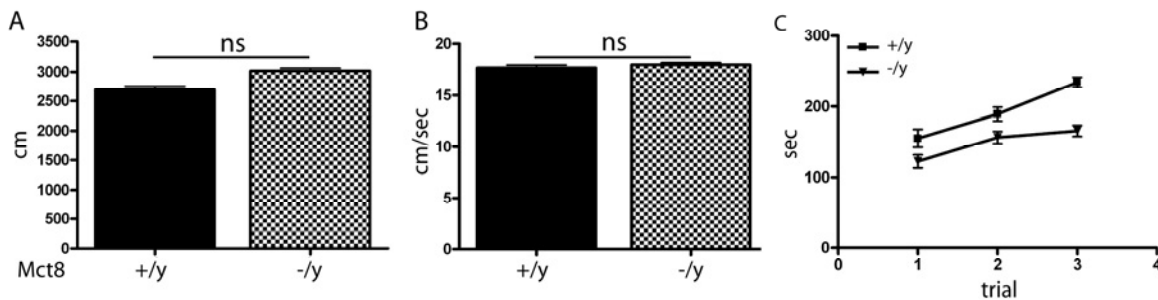


Abbildung 15: Untersuchungen zum Bewegungsverhalten

Anhand des *Open Field Tests* wurden gesamte zurückgelegte Distanz (A) und mittlere Bewegungsgeschwindigkeit (B) untersucht. Des Weiteren wurde ein *Rotarod-Test* durchgeführt (C) (n=15). Es konnten keine Unterschiede im Bewegungsverhalten zwischen Mct8^{+/-} und Mct8^{-/-} Mäusen festgestellt werden. Nicht signifikant (ns), t-Test von Student.

Im modifizierten SHIRPA (Hatcher et al. 2001) Test wurden 24 verschiedene Parameter beleuchtet. Es wurden 10 Mct8^{+/-} und 11 Mct8^{-/-} Tiere im Alter von 18 Wochen untersucht. Zuerst wurden Verhaltensparameter wie die Körperhaltung, das Vorhandensein eines Tremor, Lidschluss, das Aussehen des Fells und das Vorhandensein von Tasthaaren sowie das Vorhandensein von Tränenfluss und Defäkation dokumentiert. Hier zeigte der Test in keinem der untersuchten Parameter einen Unterschied (Tab. 15).

Tabelle 15: modifizierter SHIRPA Test – Teil 1: Verhalten bei Beobachtung in einem Glasgefäß

Parameter	+/-	-/-	
Körperhaltung			
inaktiv	0	0	
aktiv	10	11	ns
überhöhte Aktivität	0	0	
Tremor			
nicht vorhanden	10	11	ns
vorhanden	0	0	
Lidschluss			
Augen geöffnet	10	11	ns
Augen geschlossen	0	0	

Ergebnisse

Aussehen des Fells			
ordentlich und gepflegt	10	11	ns
Unregelmäßigkeiten	0	0	
Tasthaare			
vorhanden	10	11	ns
nicht vorhanden	0	0	
Tränenfluß			
nicht vorhanden	10	11	ns
vorhanden	0	0	
Defäkation			
vorhanden	10	11	ns
nicht vorhanden	0	0	

Im nächsten Teil dieser Tests wurden die Bewegungsaktivität und das Verhalten in einer unbekannten Arena aufgezeichnet. Parameter waren hier Erregung beim Umsetzen, Gang, Haltung des Schwanzes, Weglaufen bei Berührung und Reaktion auf Hochheben (Tab. 16).

Tabelle 16: modifizierter SHIRPA Test – Teil 2: Bewegung in einer unbekannten Arena

Parameter	+/ <i>y</i>	-/ <i>y</i>	
Erregung beim Umsetzen			
verlängertes Erstarren	0	0	
kurzes Erstarren	10	11	ns
sofortige Bewegung	0	0	
Gang			
flüssige Bewegung	10	11	ns
fehlende flüssige Bewegungen	0	0	
Haltung des Schwanzes			
schleifend	0	0	
horizontal ausgestreckt	2	0	ns
hochgestellter Schwanz	8	11	
Weglaufen bei Berührung			
keine Reaktion	0	0	
Reaktion auf Berührung	10	11	ns
Weglaufen vor Berührung	0	0	
Reaktion auf Hochheben			
wehrt sich	10	11	ns
keine Reaktion	0	0	

Diese Parameter zeigten ebenso ein völlig normales Verhalten der *Mct8*-defizienten Mäuse. Der letzte Abschnitt des SHIRPA Protokolls beinhaltete die Aufzeichnung von Verhalten über bzw. in der Arena mit folgenden Parametern: Hautfarbe, gekrümmter Rumpf, Aneinanderklammern der Extremitäten beim Hochheben, Pinna-Reflex, Kornealreflex, Reflex sich aufzurichten, Aufrichten bei Berührung, Bissigkeit und Vokalisation (Tab. 17). Dieser Teilabschnitt der Untersuchungen konnte ebenfalls keinen Unterschied zwischen *Mct8*^{+/*y*} und *Mct8*^{-/*y*} Mäusen finden. Somit sind *Mct8*-

defiziente Mäuse im SHIRPA Test ihren Wurfgeschwistern als gleichwertig anzusehen.

Tabelle 17: modifizierter SHIRPA Test – Teil 3: Verhalten über bzw. in der Arena

Parameter	+/y	-/y	
Hautfarbe			
gebleicht	0	0	
rosa	10	11	ns
tief rot	0	0	
gekrümmter Rumpf			
nicht vorhanden	10	11	ns
vorhanden	0	0	
Aneinanderklammern der Extremitäten beim Hochheben			
nicht vorhanden	10	11	ns
vorhanden	0	0	
Pinna Reflex			
vorhanden	10	11	ns
nicht vorhanden	0	0	
Kornealreflex			
vorhanden	10	11	ns
nicht vorhanden	0	0	
Reflex sich aufzurichten			
richtet sich auf	10	11	ns
richtet sich nach	0	0	
Loslassen nicht auf			
Aufrichten bei Berührung			
vorhanden	10	11	ns
nicht vorhanden	0	0	
Bissigkeit			
nicht vorhanden	10	11	ns
vorhanden	0	0	
Vokalisation			
nicht vorhanden	10	11	ns
vorhanden	0	0	

Im *Open Field Test* konnten noch weitere Parameter untersucht werden. Diese Parameter geben einen Hinweis auf ein verändertes Angstverhalten. *Mct8*-defiziente Tiere zeigten ein vermehrtes Betreten des Feldes (*entries on board*), ein längeres Verweilen im Feld (*time on board*) sowie einen vergrößerten durchschnittlichen Abstand zur Wand (*mean distance to wall*) und einen verringerten durchschnittlichen Abstand zum Brett (*mean distance to board*), welches sich in der Mitte des Feldes befindet (Abb. 16A). Dies deutete auf ein reduziertes Angstverhalten hin, dass bei Nagern gemeinhin bei Hyperthyreose so beschrieben wird.

Das Putzverhalten der Tiere wird im *Open Field Test* ebenfalls dokumentiert. Hierbei ließ sich eine gesteigerte Latenz bis zum Putzen sowie eine verringerte Putzdauer

feststellen (Abb. 16B). Beides sind Ergebnisse, die bei Hypothyreose in Ratten beschrieben sind.

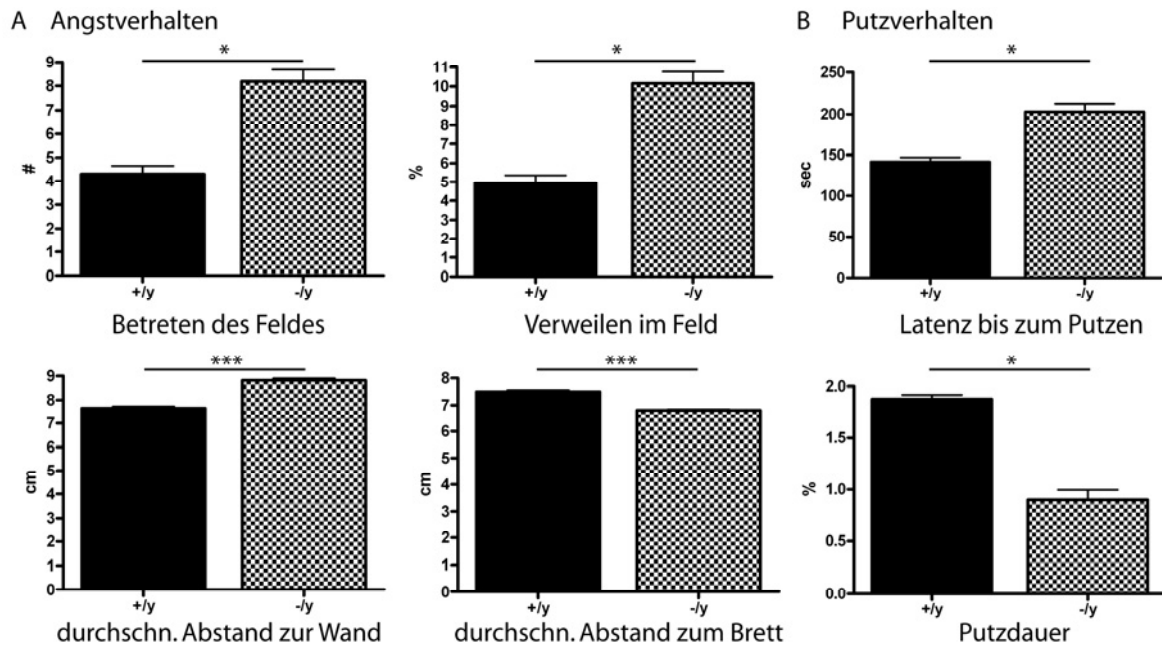


Abbildung 16: Open Field Test

Im *Open field Test* wurde das Angstverhalten (A) und das Putzverhalten (B) von $Mct8^{+/y}$ und $Mct8^{-/y}$ Mäusen untersucht. Hierzu wurden Betreten des Feldes, Verweilen im Feld, durchschn. Abstand zur Wand, durchschn. Abstand zum Brett sowie Latenz bis zum Putzen und Putzdauer analysiert. Parameter des Angstverhaltens waren ähnlich wie bei einer Hyperthyreose verändert, Parameter des Putzverhaltens wiesen auf eine Hypothyreose hin ($n=15$). * $p<0,05$; *** $p<0,001$; t-Test.

Bei einer Untersuchung zum Schmerzempfinden der Tiere mittels eines *Hot Plate Tests* wurde eine verminderte Latenz bis zum Schütteln der Hinterpfoten und bis zum Herausspringen aus dem Messinstrument dargestellt (Tab. 18). Untersucht wurden 10 $Mct8^{+/y}$ und 10 $Mct8^{-/y}$ Tiere im Alter von 20 Wochen. Diese Befunde deuteten auf eine Hyperalgesie hin, wie man sie bei Nagern mit Hyperthyreose findet.

Tabelle 18: Hyperalgesie bei $Mct8^{-/y}$ Mäusen

Parameter	+/y	-/y	
Schütteln der Hinterpfoten	11,54 ± 1,08	9,31 ± 1,31	**
Lecken der Hinterpfoten	18,46 ± 2,84	16,64 ± 1,6	ns
Herausspringen	50,44 ± 2,97	43,51 ± 3,24	**

Die Schmerzempfindlichkeit von $Mct8^{+/y}$ und $Mct8^{-/y}$ Mäusen wurde mit Hilfe des *Hot Plate Tests* untersucht. $Mct8$ -defiziente Mäuse zeigten ein deutlich erhöhtes Schmerzempfinden. ** $p<0,01$, nicht signifikant (ns); ANOVA.

3.2.6 Schilddrüse

3.2.6.1 Expression von Mct8 in der Schilddrüse

In Abbildung 7A und 7B wurde bereits die Expression von Mct8 in der Schilddrüse der adulten Maus und des Menschen mittels Western Blot gezeigt und wird hier zur Verdeutlichung zur Expression im Gehirn verglichen (Abb. 17A). Sowohl murin als auch human ist eine stärkere Expression von Mct8 in der Schilddrüse zu erkennen. Eine immunhistochemische Analyse von murinen Schilddrüsen zeigte eine deutliche membranständige basolaterale Färbung der Thyrozyten. Diese Färbung war bei Mct8^{-/-} Schilddrüsen nicht vorhanden und zeigt somit einmal mehr die Spezifität des α -Mct8 Antikörpers. In Schnitten von humanen Schilddrüsen konnte die gleiche basolaterale Verteilung von MCT8 mittels Immunhistochemie gezeigt werden (Abb. 17).

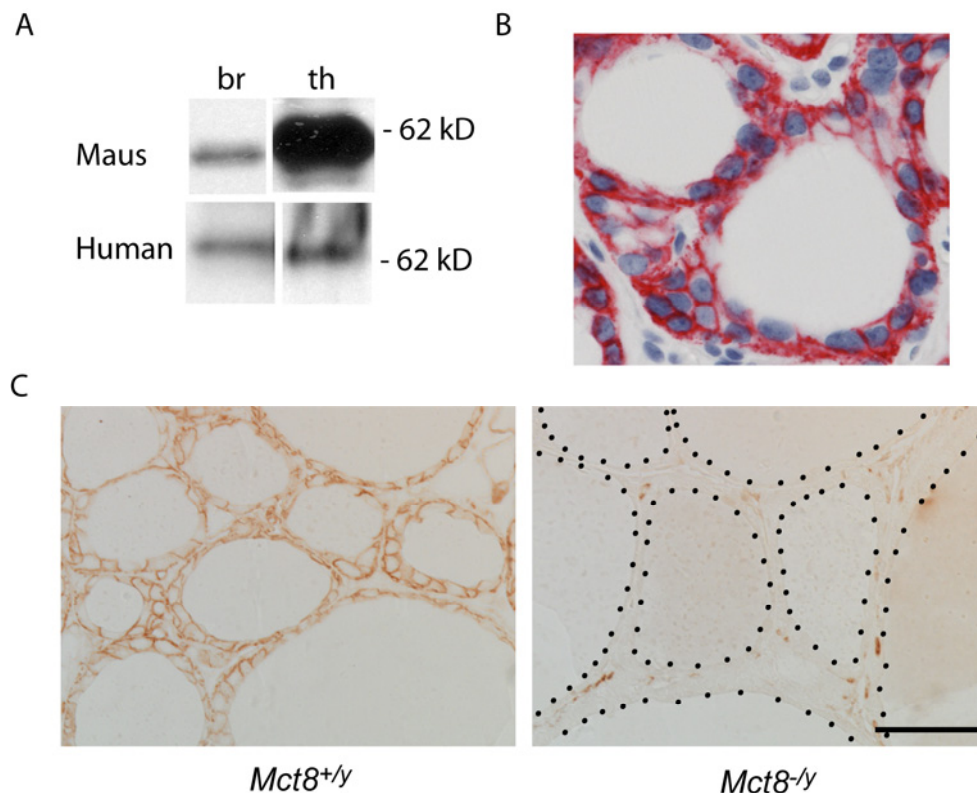


Abbildung 17: Lokalisation von Mct8 in der Schilddrüse

Mct8 ist in murinen und humanen Schilddrüsen stärker exprimiert als im Gehirn (A). In humanem Schilddrüsenengewebe konnte eine basolaterale Lokalisation von MCT8 gezeigt werden (B). Murine Schilddrüsen zeigen ebenfalls diese basolaterale Lokalisation. In Mct8^{-/-} Mäusen ist wie zu erwarten keine Färbung vorhanden (C). Maßstabsbalken 50 μ m.

3.2.6.2 Veränderungen der Schilddrüse in *Mct8*-defizienten Mäusen

Die histologische Untersuchung von Schilddrüsen *Mct8*-defizienter Mäuse im Alter von sieben Monaten zeigte anhand von HE-Färbungen erstmals krankhafte Veränderungen der Schilddrüse. Es waren deutlich vergrößerte Follikel sowie papilläre Auswüchse, typische Veränderungen der Kerne (Milchglaskerne und dachziegelartige Stapelungen) und miteinander verwachsene, schlecht definierte Follikel zu erkennen. Schilddrüsen von Wurfgeschwistern zeigten keine Abnormalitäten (Abb. 18A). Färbungen mit Antikörpern gegen Thyroglobulin (Tg) und den Natrium-Iodid-Symporter (NIS) zeigten keine Auffälligkeiten. Tg ist immer noch in den Follikeln enthalten und weist keine immunhistochemisch detektierbaren Veränderungen auf. NIS ist ebenfalls noch wie bei *Mct8*^{+/-} Tieren basolateral in Thyrozyten lokalisiert (Abb. 18A). Die Größe der Follikel und die Epithelhöhe wurde, wie unter Friedrichs et al. beschrieben, gemessen und ausgewertet (Abb. 18B und C) (Friedrichs et al. 2003).

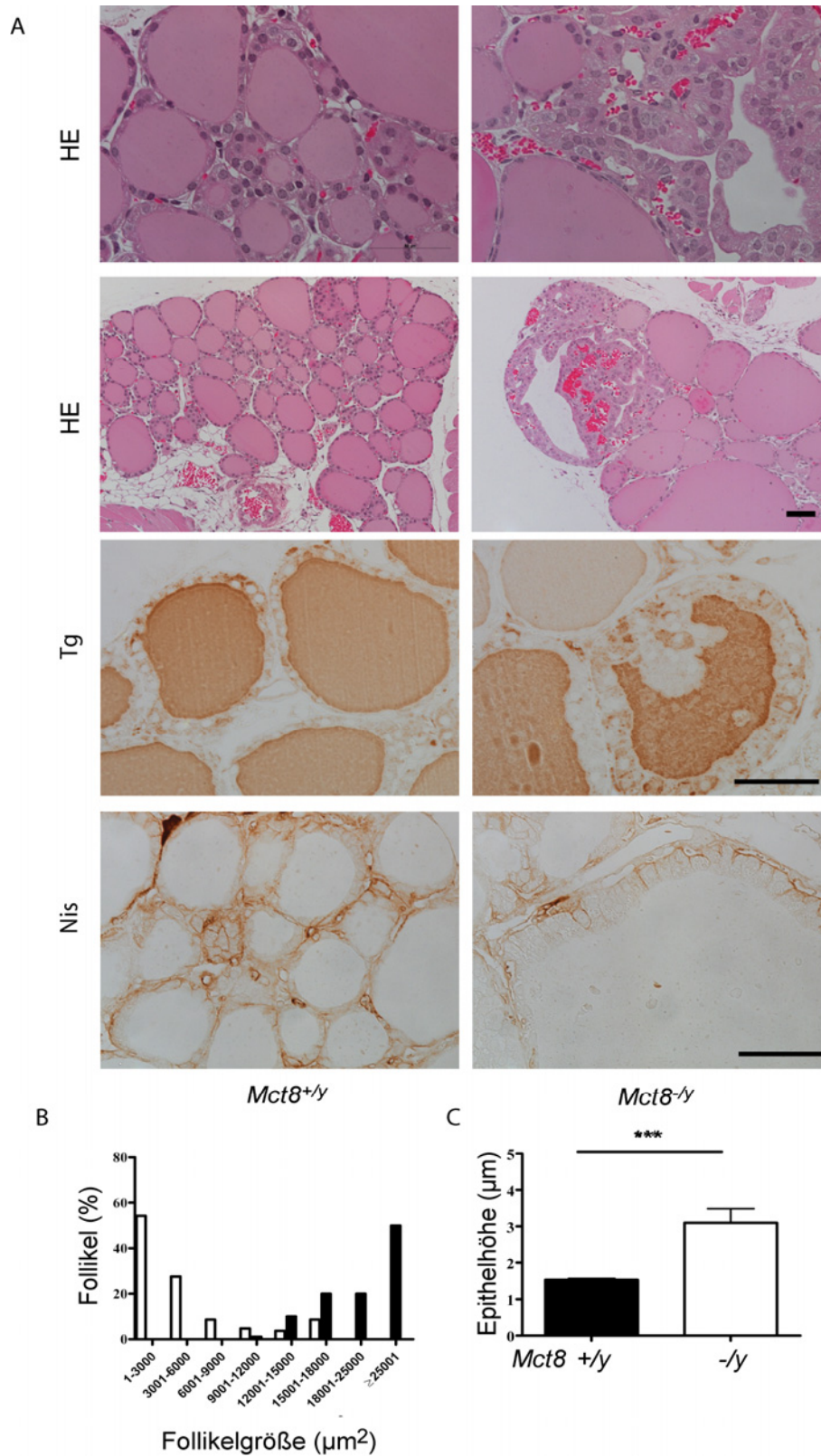


Abbildung 18: Papilläre Strukturen in *Mct8*-defizienten Schilddrüsen

Schilddrüsen von *Mct8*-defizienten Mäusen weisen follikuläre Tumore mit papillären Strukturen und charakteristischen Kernveränderungen auf (A). HE-Färbungen zeigen deutlich die histologischen Veränderungen. Färbungen mit Antikörpern gegen Tg und NIS zeigten keine Unterschiede. Maßstabsbalken 50 μm . Follikelgröße (B) und Epithelhöhe (C) der Follikel sind in *Mct8^{-/-}* Mäusen deutlich erhöht. *** $p < 0,001$; t-Test.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden Schilddrüsen von 4 $Mct8^{+/y}$ und 4 $Mct8^{-/y}$ Tiere, die jünger als 6 Monate waren, 14 $Mct8^{+/y}$ und 14 $Mct8^{-/y}$ Tiere im Alter zwischen 6 Monaten und einem Jahr sowie 8 $Mct8^{+/y}$ und 12 $Mct8^{-/y}$ Tiere, die älter als ein Jahr waren, histopathologisch untersucht. HE-Färbungen von Paraffinschnitten der Schilddrüse wurden angefertigt und ausgewertet. Im Alter von bis zu 6 Monaten wies eine Schilddrüse von $Mct8$ -defizienten Mäusen bereits papilläre Veränderungen auf. Alle Schilddrüsen von $Mct8^{+/y}$ Tieren waren normal. Im Alter zwischen 6 Monaten und einem Jahr wiesen bereits über 40% der untersuchten $Mct8^{-/y}$ Schilddrüsen krankhafte papilläre Strukturen und veränderte Follikel auf. Alle untersuchten $Mct8^{+/y}$ Schilddrüsen waren unauffällig. Schilddrüsen von $Mct8^{-/y}$ Tieren, die älter als ein Jahr waren, wiesen fast alle Veränderungen auf (Abb. 19). 10 von 12 untersuchten Schilddrüsen zeigten in den untersuchten Schnitten deutlich erkennbare papilläre Schilddrüsentumore. Zwei der untersuchten $Mct8^{+/y}$ Tiere in diesem Alter zeigten ebenfalls benigne Veränderungen der Schilddrüse, die jedoch anders als die Tumore der $Mct8$ -defizienten Mäuse aussehen.

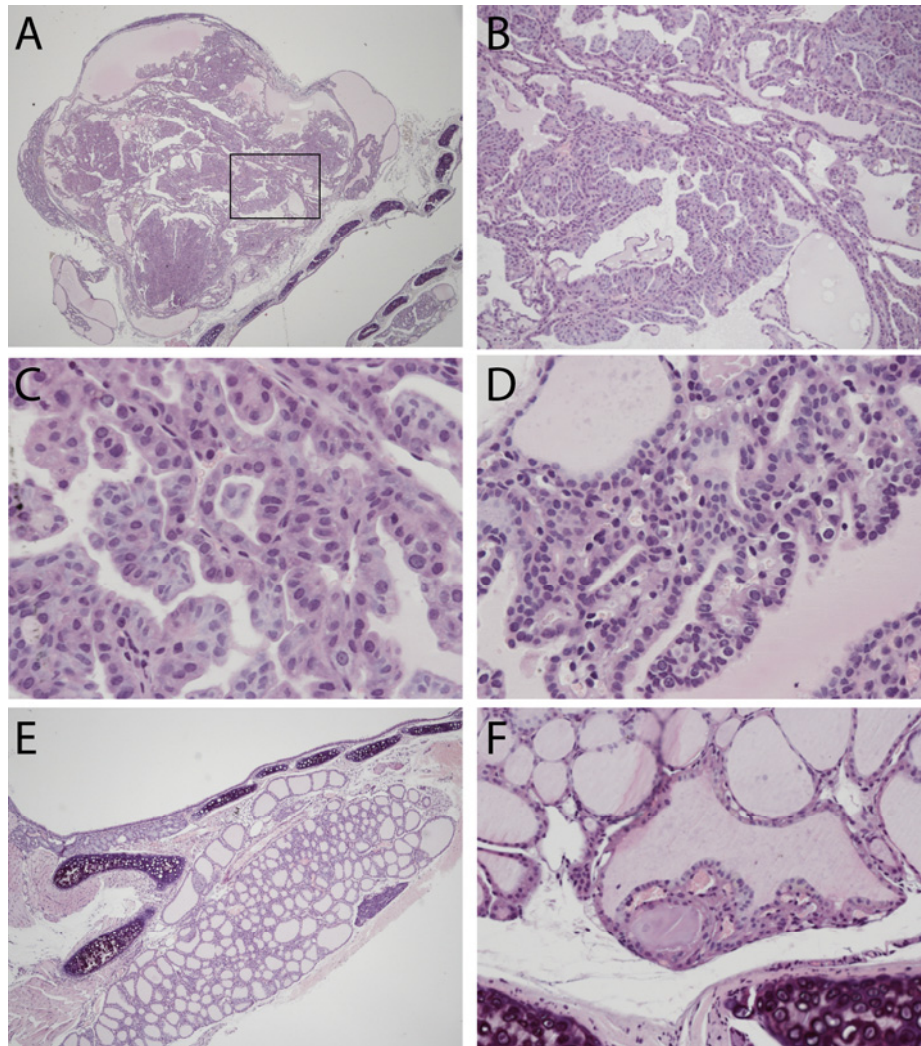


Abbildung 19: Schilddrüsentumore mit Charakteristika von papillären Karzinomen

Die Schilddrüse dieser 650 Tage alten $Mct8^{-/-}$ Maus ist fast vollständig von einem Tumor ausgefüllt (A); Vergrößerungen aus diesem Tumor zeigen deutliche papilläre Strukturen (B und C) sowie typische Kernveränderungen (D). Am Beispiel einer 78 Tage alten $Mct8^{-/-}$ Maus wird der Beginn der Tumorentwicklung mit einem papillären Microkarzinom gezeigt (E). Erst in einer bereits 600 Tage alten $Mct8^{+/-}$ Maus lassen sich kleine papilläre Veränderungen nachweisen, die auf einen papillären Microtumor hinweisen (F).

Abbildung 20 zeigt eine graphische Darstellung der progressiven Zunahme an krankhaft veränderten Schilddrüsen.

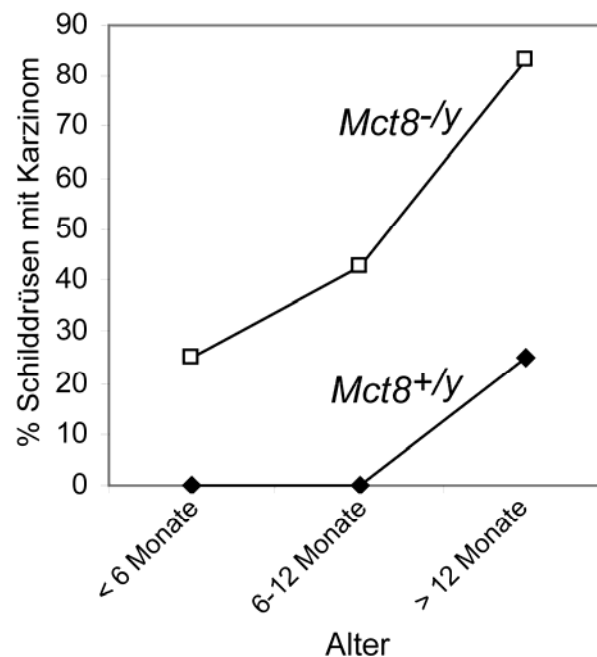


Abbildung 20: Progressive Schilddrüsenpathologie in *Mct8*-defizienten Schilddrüsen

Der Anteil an Schilddrüsen mit papillären Karzinomen steigert sich bei *Mct8*^{-/-} Mäusen mit zunehmendem Alter. Im Alter von 6-12 Monaten zeigen bereits mehr als 40% der *Mct8*-defizienten Mäuse Karzinome, wohingegen alle Wurfgeschwister eine normale Schilddrüse haben. *Mct8*^{-/-} Mäusen, die älter als 12 Monate waren, zeigten in über 80% papilläre Schilddrüsenkarzinome. Bei zwei Wurfgeschwistern konnten in diesem fortgeschrittenen Alter beginnende papilläre Veränderungen nachgewiesen werden.

3.3 Andere Schilddrüsenhormontransporter in Maus und Mensch

3.3.1 Expression von verschiedenen Transportern in der Schilddrüse

Die Expression der folgenden Schilddrüsenhormontransporter wurde mittels qPCR in der Schilddrüse von Mäusen untersucht: *Mct8*, *Lat1*, *Lat2*, *Mct10*, *Slco1c1*, *Slco4a1*, *Slco4c1*, *Slco1a1*, *Slc10a1*, *Slco6b1*, *Slco6c1*, *Slco1a4*, *Slco1a5* und *Slco1b2*. 18SrRNA diente als *housekeeping gene*. *Slco1c1*, *Slco1a1*, *Slc10a1*, *Slco6b1*, *Slco6c1*, *Slco1a4*, *Slco1a5* und *Slco1b2* konnten in der murinen Schilddrüse nicht detektiert werden und wurden somit für weitere Untersuchungen der Schilddrüse ausgeschlossen. *Mct8* zeigte, wie bereits anhand des Western Blots in Abbildung 7 zu erwarten, eine sehr starke Expression. *Mct10*, *Lat1*, *Lat2*, *Slco4a1* und *Slco4c1* konnten mit einer im Vergleich zu *Mct8* geringen Expression detektiert werden (Abb. 21).

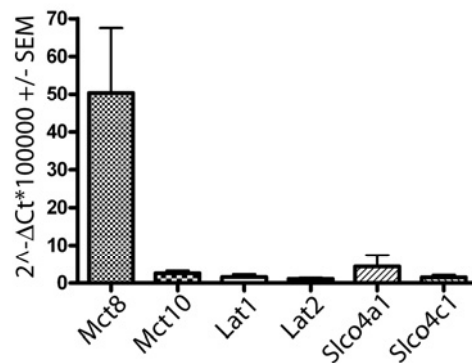


Abbildung 21: Expression von Schilddrüsenhormontransportern in murinen Schilddrüsen

Sechs verschiedene Schilddrüsenhormontransporter konnten in murinen Schilddrüsen mittels qPCR detektiert werden. Werte sind dargestellt als $2^{-\Delta C_t} \cdot 100000 \pm \text{SEM}$. Normalisierung auf 18SrRNA.

cDNA von humanen Schilddrüsen wurde von Biocat, Heidelberg erworben und mittels qPCR auf die Expression der Schilddrüsenhormontransporter MCT8, LAT1, LAT2, MCT10, SLCO1C1, SLCO4A1, SLCO4C1 und SLC10A1 hin untersucht. β -Aktin diente als *housekeeping gene*. SLC10A1 konnte wie zu erwarten auch in der humanen Schilddrüse nicht detektiert werden. MCT8 und LAT2 wiesen eine starke Expression auf (Abb. 22).

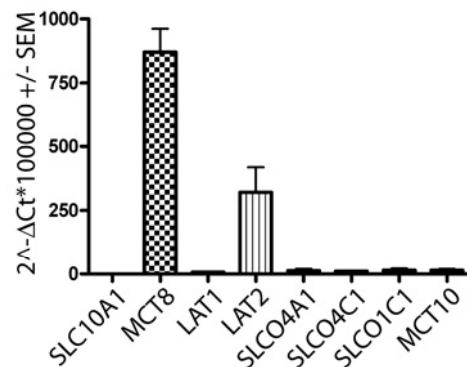


Abbildung 22: Expression von Schilddrüsenhormontransportern in humanen Schilddrüsen

Die Expression von Schilddrüsenhormontransportern wurde mittels qPCR in humaner Schilddrüse untersucht. MCT8 und LAT2 zeigen eine deutliche Expression. Werte sind dargestellt als $2^{-\Delta C_t} \cdot 100000 \pm \text{SEM}$. Normalisierung auf β -Aktin.

3.3.2 Expression von verschiedenen Schilddrüsenhormontransportern in Gehirnarealen der Maus während der Entwicklung

Die bisher dargestellten Ergebnisse weisen mit unterschiedlichen Befunden auf eine lokal unterschiedliche Versorgung mit Schilddrüsenhormonen hin. Verschiedene Zelltypen bzw. Gehirnareale scheinen mit den im Serum befindlichen hohen Konzentrationen an T_3 versorgt zu werden oder auch nicht. Da *Mct8*-defiziente Tiere auch eine partielle Hyperthyreose aufwiesen, musste angenommen werden, dass es andere Schilddrüsenhormontransporter im Gehirn und in Neuronen gibt. Es wurden folgende beschriebene Schilddrüsenhormontransporter auf ihre Expression in primären Kulturen kortikaler Neurone hin untersucht: *Slco6b1*, *Slco6b1*, *Slco1b2*, *Slco1a5*, *Slco1a4*, *Slco1a1*, *Slc10a1*, *Mct8*, *Slc7a5* (Lat1), *Slc7a8* (Lat2), *Slc16a10* (*Mct10*), *Slco1c1*, *Slco4a1* und *Slco4c1*. Wie in Abbildung 23 dargestellt sind *Mct8*, Lat1 und Lat2 relativ stark exprimiert; *Mct10*, *Slco1c1*, *Slco4a1* und *Slco4c1* konnten mittels qPCR detektiert werden, sind jedoch in deutlich geringerem Maße exprimiert. Die restlichen Transporter konnten nicht in kultivierten Neuronen detektiert werden. Neurogranin (*RC3*) ist ein neuronal exprimiertes, T_3 -induziertes Gen und diente hier als Positivkontrolle. 18srRNA diente als *housekeeping gene*.

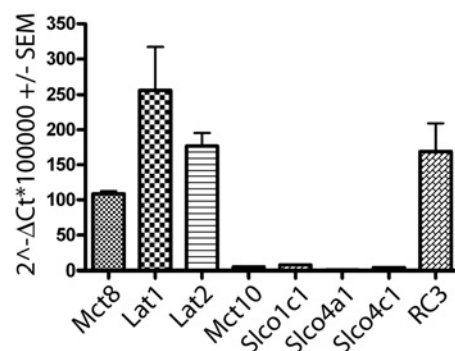


Abbildung 23: Expression von Schilddrüsenhormontransportern in kultivierten kortikalen Neuronen

Primäre kortikale Neurone wurden isoliert und kultiviert. Mittels qPCR wurde die Expression verschiedenster Schilddrüsenhormontransporter untersucht. *Mct8*, Lat1 und Lat2 sind am stärksten in Neuronen exprimiert. Normalisierung auf 18srRNA.

Da Schilddrüsenhormone für bestimmte Funktionen sowie die Reifung und Entwicklung verschiedener Zelltypen in verschiedenen Gehirnarealen zu verschiedenen Zeitpunkten der Entwicklung benötigt werden, wurde die Expression der Transporter *Mct8*, Lat1, Lat2, *Mct10*, *Slco1c1*, *Slco4a1* und *Slco4c1* zu den Zeitpunkten E14, E16, E19, P0, P5, P10, P15 und P20 im Neokortex, Hippocampus

und Cerebellum untersucht (Abb. 24). Es wurden jeweils 3 RNA *pools* von jedem Zeitpunkt und jedem Areal untersucht. 18SrRNA diente als *housekeeping gene*. Da Mct10, wie bereits in kultivierten Neuronen beschrieben eine relativ geringe aber konsistente Expression zeigte, wurden die restlichen Werte auf Mct10 bezogen. Für alle untersuchten Bereiche im Gehirn ließ sich feststellen, dass die generelle Expression der Transporter zur Geburt hin ansteigt, die höchsten Werte bis P10 aufweist und danach wieder sinkt. Im Neokortex konnten alle untersuchten Transporter detektiert werden. Die höchsten Expressionslevel zeigten Mct8, Lat1 und Lat2, sowie Slco1c1. Im Hippocampus konnte ebenfalls für Mct8, Lat1 und Lat2 sowie Slco1c1 die stärkste Expression dokumentiert werden. Im Cerebellum herrschte generell eine geringere Expression der verschiedenen Schilddrüsenhormontransporter. Die bereits genannten Transporter Mct8, Lat1, Lat2 und Slco1c1 konnten jedoch auch hier am häufigsten gefunden werden. Da jedoch die Expressionslevel der Transporter in den Bereichen Neokortex, Hippocampus und Cerebellum unterschiedlich sind sowie die Expressionen sich zu verschiedenen Zeitpunkten verändern, ist von einem wahrscheinlich sehr spezifischen, spatio-temporalen Verteilungs- bzw. Expressionsmuster der bisher bekannten Schilddrüsenhormontransporter im Gehirn auszugehen.

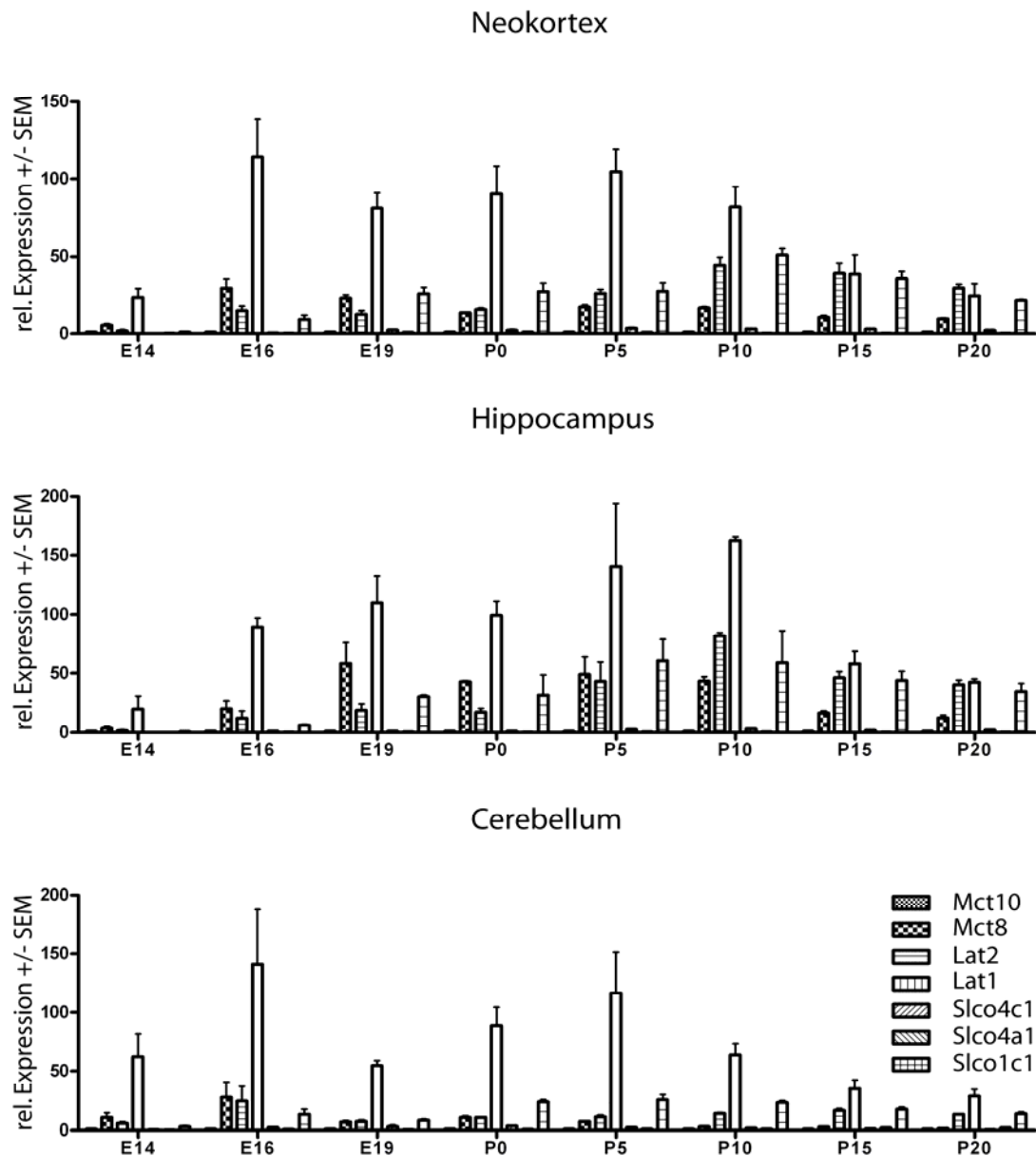


Abbildung 24: Expression von Schilddrüsenhormontransportern in verschiedenen Gehirnregionen während der Entwicklung

Die spatio-temporale Verteilung von sieben verschiedenen Schilddrüsenhormontransportern wurde in Neokortex, Hippocampus und Cerebellum untersucht. Dargestellt ist die relative Expression bezogen auf Mct10 +/- SEM. Normalisierung auf 18SrRNA.

3.3.3 Expression von verschiedenen Transportern in Zelltypen des murinen Gehirns

Um die Expression von Mct8 und anderen Schilddrüsenhormontransportern in Neuronen mit anderen Zelltypen vergleichen zu können, wurde mittels qPCR und Western Blot die Expression in reinen Kulturen von Neuronen, Astrozyten und Mikroglia untersucht. Die Reinheit der einzelnen kultivierten Zelltypen wurde mittels

Western Blot überprüft. Spezifische Marker der einzelnen Zelltypen zeigten jeweils nur eine Bande in ihrem entsprechenden Zelltyp (Daten nicht gezeigt). Mittels qPCR wurde die Expression von folgenden Transportern untersucht: Mct8, Lat1, Lat2, Mct10, Slco1c1, Slco4a1 und Slco4c1. 18SrRNA diene als *housekeeping gene* in der qPCR. Die am stärksten exprimierten Transporter in Neuronen sind Mct8, Lat1 und Lat2. Slco1c1 zeigt eine schwache Expression in Neuronkulturen; Mct10, Slco4a1 und Slco4c1 zeigen eine sehr geringe, kaum detektierbare Expression. In Astrozyten zeigt sich ein ähnliches Bild. Mct8, Lat1 und Lat2 sind am stärksten exprimiert, jedoch zu einem geringeren Level als in Neuronen. Slco1c1 zeigt eine schwache Expression und die Expression der restlichen untersuchten Transporter Mct10, Slco4a1 und Slco4c1 ist auch in Astrozyten sehr gering bzw. kaum detektierbar. Die Expression der Transporter in Mikroglia unterscheidet sich stark von der Expression in Neuronen und Astrozyten. Lat2 ist der am stärksten exprimierte Transporter in Mikroglia, gefolgt von Mct10, Lat1 und Slco4a1. Mct8 und Slco1c1 zeigen eine nur schwache Expression in Mikroglia, wohingegen Slco4c1 nicht detektierbar ist (Abb. 25A). Mittels Western Blot wurde ebenfalls die Expression von Mct8, Lat1 und Lat2 in kultivierten Neuronen, Astrozyten und Mikroglia sowie in einer Endothelzelllinie, rBCEC4, untersucht. Hier konnte eine Proteinexpression gezeigt werden, die bei Neuronen und Astrozyten der RNA-Expression entspricht. Alle hier untersuchten Transporter sind in Neuronen und Astrozyten auch auf Proteinebene exprimiert. Ebenso konnte mit Hilfe der Endothelzelllinie rBCEC4 die Expression von Mct8, Lat1 und Lat2 in Endothelzellen belegt werden. Eine Expression in Mikroglia konnte mittels Western Blot nur für Lat2 bestätigt werden. β -Aktin diene als Ladekontrolle im Western Blot (Abb. 25B).

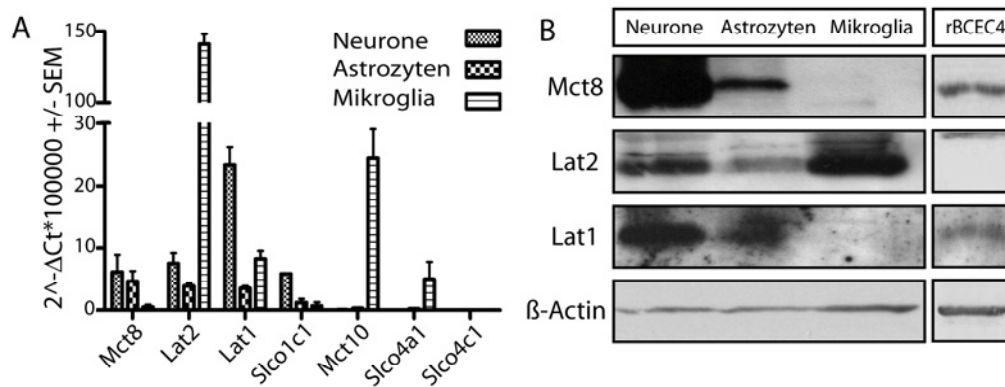


Abbildung 25: Schilddrüsenhormontransporter in Neuronen, Astrozyten und Microglia

Die Expression von Schilddrüsenhormontransportern wurde in kultivierten Neuronen, Astrozyten und Microglia mittels qPCR untersucht (A). Normalisierung auf 18SrRNA. Mct8, Lat2 und Lat1 sind sowohl in Neuronen als auch in Astrozyten exprimiert, wohingegen Lat2 deutlich in Microglia detektierbar ist, Lat1 in geringerem Maße. Des Weiteren konnten Mct10 und Slco4a1 in Microglia detektiert werden. Die Ergebnisse für Mct8, Lat2 und Lat1 wurden per Western Blot auf Proteinebene überprüft und zeigen weitgehend das gleiche Expressionsmuster (B). Proteinexpression von Lat1 in Microglia konnte nicht detektiert werden. β-Aktin diente als Ladekontrolle.

3.3.4 Expression von Transportern in humanem Gehirn

Die Expression der Schilddrüsenhormontransporter MCT8, LAT1, LAT2, SLCO1C1, MCT10, SLCO4A1, SLCO4C1 und SLC10A1 wurde mittels qPCR in cDNA von humanem adulten cerebralen Kortex (Biocat, Heidelberg) untersucht. β-Aktin diente als *housekeeping gene*. SLC10A1 konnte wie erwartet nicht detektiert werden. MCT8 und SLCO1C1 konnten mit der stärksten Expression detektiert werden, gefolgt von LAT2 und SLCO4A1 sowie LAT1 mit einer mittleren Expression. SLCO4C1 ist in geringer Menge detektierbar, MCT10 wies dagegen eine sehr geringe Expression aufwies (Abb. 26).

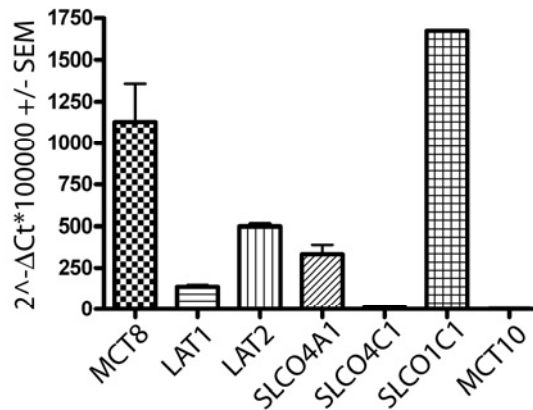


Abbildung 26: Schilddrüsenhormontransporter in humanem Gehirn

MCT8, LAT1 und LAT2, sowie SLCO4A1 und SLCO1C1 konnten mittels qPCR in adultem cerebralen Kortex detektiert werden. Werte sind dargestellt als $2^{-\Delta C_t} \cdot 100000 \pm \text{SEM}$. Normalisierung auf β -Aktin.

3.3.5 Schilddrüsenhormontransporter in der humanen Gehirnentwicklung

Die bisher gezeigten Phänotypen der *Mct8*-defizienten Maus unterscheiden sich bis auf die ebenfalls veränderten Schilddrüsenhormonwerte doch deutlich vom humanen Phänotyp eines Allan-Herndon-Dudley Patienten. Die in Abschnitt 3.3 dargelegten Ergebnisse zeigen deutlich, dass in der Maus sowie in adulten humanen Geweben auch andere Schilddrüsenhormontransporter exprimiert werden. Da die vorherigen Ergebnisse LAT2 als ebenfalls stark exprimierten Transporter im Gehirn dargestellt haben, wurde die Expression von LAT2 näher untersucht. In Abbildung 27A ist die Proteinexpression von LAT2 in verschiedenen Geweben dargestellt. Hierzu wird im Vergleich noch einmal die Expression von MCT8 in humanen Geweben gezeigt. LAT2 ist in Gehirn, Herz und Leber deutlich exprimiert, MCT8 hingegen zusätzlich in der Hypophyse und nur sehr gering im Herz. Deutlich erkennbar sind die unterschiedlichen Größen von LAT2 und MCT8 sowie die unterschiedliche Expressionsstärke in verschiedenen Geweben. Um eine mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Phänotypen von *Mct8*-defizienten Menschen und Mäusen zu finden, wurden mittels Immunhistochemie Schnitte von 14 verschiedenen humanen embryonalen Gehirnen während der Entwicklung in den Gestationswochen (GW) 13 bis 40 mit Antikörpern gegen MCT8 und LAT2 gefärbt und ausgewertet. MCT8 konnte erstmals in GW 25 in Blutgefäßen detektiert werden. Die Expression dort blieb zu allen untersuchten Zeitpunkten erhalten. Ab GW 30 konnte eine Färbung der

Pyramidenzellen im cerebralen Kortex festgestellt werden. Mit zunehmendem Alter verstärkte sich die Intensität dieser Färbung. Von GW 32 an konnte im Hippocampus und Kortex das adulte Expressionsmuster von MCT8 detektiert werden. Die Expressionsstärke stieg noch während der weiteren Entwicklung. Zusätzlich war im Hippocampus in GW40 ein ähnliches Verteilungsmuster von MCT8 zu erkennen wie in der Maus. Im Gyrus dentatus sind die Dendriten der Körnerzellen, die sich in der Molekularschicht befinden, deutlich gefärbt, wohingegen die Axone der gleichen Körnerzellen, welche sich im Stratum lucidum befinden, keine Expression zeigen. MCT8 ist ab GW 25 mit einer basolateralen Expression auch im Plexus choroideus detektierbar. Diese entspricht der bereits gezeigten basolateralen Lokalisation im Plexus choroideus der Maus.

LAT2 konnte in adulten humanen Neuronen im Kortex deutlich nachgewiesen werden. Während der Entwicklung konnte weder im Kortex noch im Hippocampus eine Expression von LAT2 detektiert werden (Abb. 27). LAT2-Expression war jedoch deutlich in Mikroglia erkennbar. Im Plexus choroideus konnte nur eine schwache Färbung detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

Die Expression von Lat2 in Neuronen des murinen Kortex und Cerebellum würde eine Erklärung für den phänotypischen Unterschied zwischen Maus und Mensch liefern: Humane Neurone müssen sich exklusiv auf MCT8 als Schilddrüsenhormontransporter verlassen, wohingegen murine Neurone bei dem Fehlen von Mct8 auf einen anderen Schilddrüsenhormontransporter, z. B. den hier gezeigten Lat2, zur Kompensation ausweichen könnten.

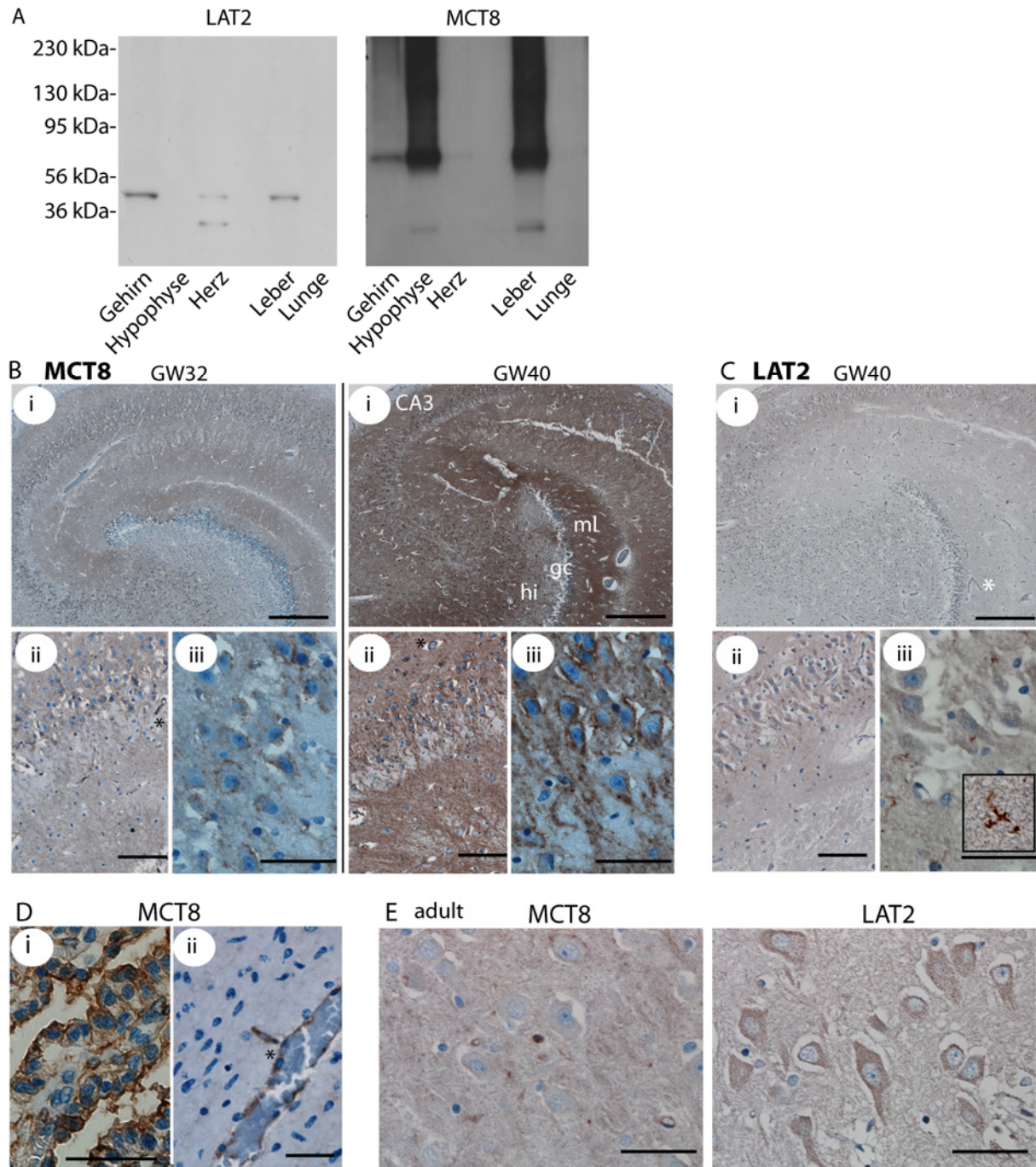


Abbildung 27: Schilddrüsenhormontransporter während der humanen Gehirnentwicklung

(A) Expression von LAT2 und MCT8 in humanen Geweben mittels Western Blot. LAT2 ist in Gehirn, Herz und Leber exprimiert. (B-E) Mit Hilfe von immunhistochemischen Färbungen konnte eine Steigerung der Expression von MCT8 im humanen Gehirn während der Entwicklung gezeigt werden (B). i: Hippocampus. Maßstabsbalken 500 µm. ii: CA3. Maßstabsbalken 100 µm. iii: CA3. Maßstabsbalken 50 µm. Exemplarisch gezeigt sind GW32 und GW40. Immunhistochemische Färbungen konnten keine neuronale Expression von LAT2 darstellen. Microglia sind in jedoch deutlich LAT2-positiv (GW40)(iii, Kästchen) (C). Maßstabsbalken wie in (B). MCT8 in GW25 Plexus Choroideus (i) (Maßstabsbalken 50 µm) und Gefäße (ii) (D). Hippocampale CA3 Neurone in adultem humanem Gehirn weisen eine deutliche MCT8 und LAT2 Färbung auf (E). Maßstabsbalken 50 µm. Kapillaren sind mit Sternchen markiert.

4. Diskussion

Schilddrüsenhormontransporter sind essentiell für eine normale und regelrechte Entwicklung von Säugetieren, z. B. auch der des Menschen und der Maus. Um ihre Funktion in der Regulation von Genen ausüben zu können, müssen Schilddrüsenhormone in die Zielzellen verschiedener Gewebe eines Organismus transportiert werden. Nur hier erreichen sie ihre Rezeptoren, TR α und TR β , über welche sie eine positive beziehungsweise negative Regulation der Genexpression ausüben. Lange Zeit wurde allgemein akzeptiert, dass Schilddrüsenhormone Zellmembranen passiv durch Diffusion durchqueren können. Diese Aussagen wurden jedoch auch schon 1954 bezweifelt (Christensen et al. 1954), blieben aber dennoch bis in die 70er Jahre weit verbreitet. Schilddrüsenhormone sind geladene Aminosäurederivate und können aufgrund ihrer Struktur und Ladung, ähnlich wie Aminosäuren, nicht in die Zelle diffundieren. Schilddrüsenhormontransporter sind als Transmembranproteine für die Aufnahme und Abgabe von Schilddrüsenhormonen in die Zelle notwendig. Die ersten Publikationen, die funktionelle Aktivität klonierter Proteine zum gerichteten Schilddrüsenhormontransport zeigen konnten, erschienen ab 1997 und 1999 aus den Arbeitsgruppen um G. Hennemann und T. Visser sowie T. Abe (Docter et al. 1997; Abe et al. 1998; Friesema et al. 1999). Verstärktes Interesse am Transport von Schilddrüsenhormonen und den hierfür zuständigen Transmembranproteinen entstand mit der Identifizierung des Monocarboxylat-transporters 8 (MCT8) als spezifischen Schilddrüsenhormontransporter (Friesema et al. 2003) und der darauf folgenden Verknüpfung von Mutationen in humanem MCT8 mit einem schweren Syndrom X-gekoppelter mentaler Retardierung (Dumitrescu et al. 2004; Friesema et al. 2004). Patienten mit Mutationen in MCT8 zeigen deutlich gestörte Schilddrüsenhormonparameter im Serum sowie eine starke mentale Retardierung und Muskelhypotonie. Dieses Syndrom der X-gekoppelten mentalen Retardierung konnte mit dem bereits 1944 beschriebenen Allan-Herndon-Dudley-Syndrom zusammengeführt werden (Allan et al. 1944), indem eine erneute Untersuchung der 1944 beschriebenen Familien zur Entdeckung von Mutationen in MCT8 führte (Schwartz et al. 2005).

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu untersuchen, ob ein *Mct8*-defizientes Mausmodell den humanen Phänotyp repliziert und somit ein gutes Modell darstellt.

Ein Modell des Allan-Herndon-Dudley-Syndroms würde Möglichkeiten zur detaillierten Erforschung dieser Erkrankung, ihrer Mechanismen und zur Entdeckung von Therapiemöglichkeiten bieten. Im folgenden Teil werden die in dieser Arbeit erhobenen Ergebnisse diskutiert und in den Kontext der bereits vorhandenen wissenschaftlichen Erkenntnisse gestellt.

4.1 Gewebespezifische Expression von Mct8

Die hier präsentierten Daten zeigen die Expression von Mct8 während der Entwicklung zu verschiedenen Entwicklungsstadien und in verschiedenen Organen der Maus. Mct8 zeigt eine spezifische spatio-temporale Verteilung in der sich entwickelnden Maus.

Der Vergleich der Expression von Mct8 in Organen der adulten Maus und des adulten Menschen zeigt kaum Unterschiede. Lediglich in der Lunge scheint bei der Maus eine geringe Proteinexpression vorhanden, die beim Menschen nicht detektierbar ist. Beim Menschen hingegen scheint im Herz eine geringe MCT8-Expression vorzuliegen, welche bei der Maus nicht festzustellen ist. Die Maus scheint also aufgrund der ähnlichen Gewebeexpression bei Menschen und Mäusen ein gutes Modell für das Allan-Herndon-Dudley-Syndrom zu sein.

4.2 Schilddrüsenhormonwerte

Die hier beschriebenen veränderten Schilddrüsenhormonwerte bei Mct8^{-/-} Mäusen konnten auch von anderen Arbeitsgruppen in diesem Mausmodell gezeigt werden (Dumitrescu et al. 2006; Trajkovic et al. 2007). Die Schilddrüsenhormonkonstellation bei Mct8-defizienten Mäusen repliziert somit den Schilddrüsenhormon-Phänotyp bei Patienten mit dem Allan-Herndon-Dudley-Syndrom. Neuere Richtlinien für die Diagnose von Mutationen im MCT8 Gen weisen gezielt auf abnormale Schilddrüsenhormonspiegel mit stark erhöhtem T₃, niedrigem T₄ und erhöhtem TSH hin (Friesema et al. 2010). Der molekulare Mechanismus, der dieser ungewöhnlichen Schilddrüsenhormonkonstellation zugrunde liegt, konnte bisher nicht geklärt werden. Ein TSH-Suppressions-Test zeigte, dass sehr hohe T₃-Dosen nötig sind, um die TSH-Spiegel auf ein normales Level herunterzuregulieren. Dies lässt auf eine

zentrale Resistenz gegenüber Schilddrüsenhormonen schließen, welche wahrscheinlich durch die nicht mögliche Aufnahme von T_3 in Zielzellen als Ort der Regulation der HPT-Achse vermittelt wird (Dumitrescu et al. 2006; Di Cosmo et al. 2009). Dies konnte auch anhand der TRH-Expression im paraventriculären Nukleus bei $Mct8^{-/y}$ Mäusen gezeigt werden. Hier lässt sich die hohe TRH-Expression durch hohe Dosen an T_4 , jedoch nicht T_3 normalisieren, was ebenfalls für eine gehemmte Aufnahme von T_3 spricht, aber auch zeigt, dass die Regulation von TRH generell noch funktionell ist (Trajkovic et al. 2007). Eine immer noch funktionelle Regulation der HPT-Achse bei $Mct8$ -defizienten Mäusen konnte zusätzlich durch die Normalisierung von TSH sowie gewebespezifischer Dejodase-Aktivitäten durch die Gabe von 3,5-Dijodothyropropionsäure (DITPA), einem am TR aktiven Schilddrüsenhormonanalogon, gezeigt werden. Die Aufnahme von DITPA in Zellen ist nicht durch $Mct8$ limitiert (Di Cosmo et al. 2009). Wird die endogene Produktion von T_4 unterdrückt, ist es möglich bei $Mct8^{+/y}$ und $Mct8^{-/y}$ Mäusen die gleichen T_3 -Spiegel zu erreichen. Die Dejodierung von T_4 zu T_3 erscheint somit verantwortlich für die hohen Serum- T_3 -Spiegel bei $Mct8^{-/y}$ Mäusen (Dumitrescu et al. 2006). Untersuchungen der Nieren von $Mct8$ -defizienten Mäusen ergaben eine deutliche Konzentration von T_3 und T_4 in der Niere sowie eine erhöhte Ausscheidung von T_3 und T_4 über den Urin. Der Verlust von $Mct8$ könnte also sowohl die Aufnahme von Schilddrüsenhormonen aus dem Primärharn in Zellen des proximalen Tubulus der Niere und die Resorption der gleichen Hormone zurück ins Blut stören oder eine direkte Sekretion in den Endharn zur Folge haben (Trajkovic-Arsic et al. 2010). Die erhöhte Exkretion von T_4 könnte ein weiterer Parameter für die niedrigen Serum- T_4 -Werte bei $Mct8$ -defizienten Mäusen und Menschen sein. Schilddrüsenhormonspiegel im Urin wurden bei Patienten mit dem Allan-Herndon-Dudley-Syndrom bisher nicht untersucht. Sowohl in der Niere als auch in der Leber von $Mct8$ -defizienten Mäusen konnte zusätzlich eine erhöhte Aktivität der Dio1 gezeigt werden (Dumitrescu et al. 2006; Trajkovic et al. 2007; Trajkovic-Arsic et al. 2010). Diese führt ebenfalls zu einer verstärkten Dejodierung von T_4 zu T_3 und somit erniedrigten T_4 -Spiegeln.

Zusammenfassend gibt es also mehrere lokale Mechanismen sowohl für eine erhöhte Konversion von T_4 zu T_3 als auch für reduzierte T_4 -Spiegel. Weiterführende Untersuchungen sind nötig, um die verschiedenen Ebenen der Schilddrüsenhormon-Regulation bei $Mct8$ -Defizienz näher zu erforschen und um einen Weg aufzudecken, über den die Möglichkeit einer Behandlung bei Patienten besteht.

4.3 Körpergewicht

Der Einfluss von Schilddrüsenhormonen auf die Regulation des Energiestoffwechsels und daraus resultierend auf das Körpergewicht ist seit langem bekannt. T₃-Defizienz führt zu einem erhöhten Körpergewicht und Kälteintoleranz (Duntas 2002), wohingegen erhöhte T₃-Level zu einer Hitzeintoleranz und Gewichtsverlust als Ergebnis einer erhöhten metabolischen Rate führen (Moller et al. 1996). Es konnte ebenso gezeigt werden, dass erhöhte T₃-Werte zu einer erhöhten Nahrungsaufnahme bis hin zu einer Hyperphagie mit reduzierten zentralen Leptin-Spiegeln sowie erhöhten hypothalamischen NPY mRNA Leveln und gleichzeitig reduzierten POMC mRNA Leveln führen (Kong et al. 2004). Die akute bzw. chronische Gabe einer niedrigen Dosis T₃ führte ebenso zu einer erhöhten Nahrungsaufnahme ohne jedoch die Leptin-Spiegel zu beeinflussen (Kong et al. 2004; Ishii et al. 2008). Eine Stimulation des Lipidstoffwechsels, einhergehend mit erhöhten freien Fettsäurespiegeln und einer Steigerung der Liponeogenese und der β -Oxidation sowie eine Induktion von Glukoneogenese und Glykogenolyse durch T₃ sind gleichfalls beschrieben worden (Weinstein et al. 1994; Dimitriadis and Raptis 2001). Schilddrüsenhormone haben einen Einfluss auf den noradrenergen Signalweg des sympathischen Nervensystems und sind damit essentiell für die Produktion von Körperwärme und für die adrenerge Antwort des braunen Fettgewebes (Silva 1995; Silva 2006). Dies konnte auch deutlich in hypo- bzw. hyperthyreoten Tieren bestätigt werden (Cannon and Nedergaard 2004; Silva 2006). Sjögren et al. konnten 2007 belegen, dass Mäuse mit einem reduzierten Schilddrüsenhormonsignalweg durch eine Mutation im TR α hypermetabol sind, reduzierte Fetteinlagerungen, Hyperphagie und Resistenz gegen Futter-induzierte Fettleibigkeit zeigen (Sjogren et al. 2007). Bei *Mct8*-defizienten Mäusen wurde bislang nicht untersucht, welche der soeben beschriebenen Regulationen zu dem erniedrigten Körpergewicht von *Mct8*^{-/-} Mäusen beitragen. Die deutlich erhöhten zirkulierenden T₃-Spiegel führen wahrscheinlich in Geweben, bei denen die Aufnahme von T₃ nicht beeinträchtigt ist, eine hyperthyreote Stoffwechsellage mit deutlich erhöhtem Energieumsatz herbei.

4.4 Hör- und Sehfähigkeit

Verschiedenste neuronale Zelltypen sind in ihrer Entwicklung von Schilddrüsenhormonen abhängig. Sowohl in der Cochlea als auch in der Retina sind Nervenzellen für die vollständige sensorische Ausbildung notwendig.

In der Cochlea sind dies die inneren Haarzellen, welche zur Umwandlung von Schallwellen in Nervenimpulse benötigt werden. Diese inneren Haarzellen sind während der Embryonalentwicklung und neonatal sensitiv für Schilddrüsenhormone (Uziel 1986). In Mausmodellen mit Dio2- bzw. Dio3-Defizienz konnte gezeigt werden, dass ein bestimmtes Maß an Schilddrüsenhormonen für die normale Entwicklung der Cochlea nötig ist (Campos-Barros et al. 2000; Ng et al. 2004; Ng et al. 2009). Sowohl zuviel als auch zu wenig Schilddrüsenhormon führt zu einem Entwicklungsdefekt mit gestörter Hörfähigkeit. Die Hörfähigkeit von *Mct8*-defizienten Mäusen ist nicht eingeschränkt. Somit scheinen während der Entwicklung in der Cochlea die hohen zirkulierenden T_3 -Spiegel keinen Einfluss zu nehmen. Das für die normale Entwicklung notwendige T_3 wird wahrscheinlich lokal aus T_4 durch Dejodasen erzeugt. Die Aufnahme von Schilddrüsenhormonen kann auch nicht komplett von *Mct8* abhängig sein, da sonst eine hypothyreote Hörstörung vorliegen müsste.

In der Retina sind diese schilddrüsenhormonabhängigen Nervenzellen z. B. die Lichtsinneszellen, Stäbchen und Zapfen, welche mithilfe von speziellen Opsinen eintreffendes Licht in Nervenimpulse umwandeln und somit als Photorezeptoren dienen. Hypothyreote Mäuse zeigen eine verlangsamte Entwicklung von Opsinen in den Photorezeptoren der Retina und somit die Notwendigkeit für Schilddrüsenhormone in der Entwicklung des Sehvermögens (Lu et al. 2009). Ist jedoch während der Entwicklung zu viel Schilddrüsenhormon vorhanden, kann die Retina sich aufgrund von erhöhter Apoptose der Zapfen ebenfalls nicht normal entwickeln. Dio3 spielt hier als T_4 -inaktivierendes Enzym eine wichtige Rolle (Ng et al. 2010) und sorgt während der Entwicklung für eine genaue Einhaltung der notwendigen Schilddrüsenhormonspiegel. Die Sehfähigkeit von *Mct8*-defizienten Mäusen ist nicht eingeschränkt. Dies spricht dafür, dass die Retina in einer Situation der *Mct8*-Defizienz Zugang zu Schilddrüsenhormonen hat. Hierfür kämen z. B. die in der Retina exprimierten Transporter Slco1a4 und Slco1a5 in Betracht (Abe et al. 1998). Bei den erhöhten zirkulierenden Schilddrüsenhormonspiegeln muss nun entweder die Aufnahme der Schilddrüsenhormone auf ein normales Maß reguliert

sein oder es könnte eine lokale Erhöhung der Dio3 vorliegen. Die Erhöhung der Dio3 würde zu einer verstärkten lokalen Inaktivierung von T_4 zu rT_3 führen und somit das Gewebe in einer euthyreoten Stoffwechsellage halten.

Zur gewebespezifischen Expression von Dejodasen in der Cochlea und Retina sowie zur Aufnahme von Schilddrüsenhormonen in diese Gewebe liegen bisher weder bei *Mct8*-defizienten Mäusen noch Menschen weitere Daten vor. Patienten mit Allan-Herndon-Dudley-Syndrom zeigen ebenso wie *Mct8*^{-/-} Mäuse keine bekannte Beeinträchtigung der Hör- und Sehfähigkeit und könnten somit durch den gleichen Mechanismus geschützt sein.

4.5 Muskel

Eine erhöhte metabolische Rate bei erhöhten Schilddrüsenhormonspiegeln konnte bereits A. Magnus-Levy 1895 zeigen (Magnus-Levy 1895). Diese erhöhte metabolische Rate entsteht z. B. durch die Hochregulation von Genen des sarcoplasmatischen Retikulums im Skelettmuskel und der damit assoziierten Erhöhung der Kalzium-ATPase Aktivität (Simonides et al. 2001). Muskelschwäche und eine reduzierte Muskelmasse wurde bisher zumeist bei einer hyperthyreoten Stoffwechsellage beschrieben. Bei *Mct8*-defizienten Mäusen konnten weder Veränderungen der Muskelkraft noch des Bewegungsverhaltens gefunden werden. Die vorliegende muskuläre Hypotonie bei *MCT8*-defizienten Patienten wurde nicht genauer charakterisiert. Die Innervierung der Muskeln und die neuromuskuläre Reizleitung sowie die Funktion von motorischen Endplatten wurde nicht untersucht. Es kann also nicht geklärt werden, ob die Muskelschwäche eine neurogene Ursache hat oder ob die Muskelzellen selbst direkt betroffen sind. Der Unterschied zwischen *Mct8*-defizienten Mäusen und Patienten könnte also hier wieder in einer anderen Transporterausstattung im Muskel oder den stimulierenden Nerven des Muskels liegen.

4.6 *Mct8*-Defizienz im Gehirn

Obwohl *Mct8*-defiziente Mäuse keine auffälligen neurologischen Störungen zeigten, konnten doch auf molekularem Level verschiedene Befunde erhoben werden, welche dafür sprechen, dass *Mct8* im Gehirn ein essentieller Transporter ist. Trajkovic et al.

beschrieben, dass die Aufnahme von $^{125}\text{I-T}_3$ in das Gehirn von *Mct8*-defizienten Mäusen stark reduziert ist, währenddessen die Aufnahme von $^{125}\text{I-T}_4$ unverändert ist (Trajkovic et al. 2007). Dies spricht für eine Rolle von Mct8 als wichtigstem Transporter in der Blut-Hirn-Schranke in Bezug auf den Transport von T_3 , jedoch nicht auf T_4 . In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression von Mct8 im Gehirn der Maus dargestellt. Hier konnte gezeigt werden, dass Mct8 bereits zum Embryonaltag 15 als auch im adulten Tier im Plexus choroideus, entlang des ventrikulären Ependyms sowie in Blutgefäßen im Gehirn, exprimiert ist. Diese Daten stimmen mit den Daten von Roberts et al. überein, die ebenfalls eine Expression von Mct8 in der Blut-Hirn-Schranke sehen (Roberts et al. 2008b). Diese Arbeitsgruppe und andere beschreiben ebenfalls die Existenz von Slco1c1, bekanntermaßen ein T_4 -Transporter, in der Blut-Hirn-Schranke, was die funktionierende Aufnahme von $^{125}\text{I-T}_4$ in *Mct8*-defizienten Mäusen erklären würde (Sugiyama et al. 2003; Roberts et al. 2008b). Die Aktivität von Deiodase 2 (Dio2) ist in *Mct8*-defizienten Gehirnen induziert. Diese Induktion entsteht wahrscheinlich durch die erniedrigten zirkulierenden T_4 -Spiegel und soll mittels erhöhter lokaler Produktion von T_3 aus T_4 durch Dio2 genügend T_3 im Gehirn erzeugen (Dumitrescu et al. 2006; Trajkovic et al. 2007). Die Hochregulierung von Dio2 ist augenscheinlich ausreichend, um eine genügende Menge an T_3 im Gehirn zur Verfügung zu stellen, da bei *Mct8*-defizienten Mäusen keine morphologischen Veränderungen im Gehirn festgestellt werden konnten. Kürzlich konnten Morte et al. anhand von Genexpressionsdaten zeigen, dass in Abwesenheit von Mct8 nicht nur keine morphologischen Veränderungen vorliegen, sondern auch keine Schilddrüsenhormon-responsiven Gene im Gehirn reguliert sind. Die gleichzeitige Inaktivierung von Mct8 und Dio2 führte jedoch zu einer gestörten Genexpression im Gehirn, gleich der bei einer Hypothyreose. Diese Daten zeigen ebenfalls einen parallelen Weg für die Aufnahme von T_4 und T_3 ins Gehirn (Morte et al. 2010).

Gestörte Schilddrüsenhormonspiegel während der Entwicklung und im adulten Tier können sich aber ebenfalls durch veränderte Verhaltensweisen manifestieren. Zur Evaluierung ihres Verhaltens wurden *Mct8*-defiziente Mäuse mit ihren Wurfgeschwistern einer detaillierten Untersuchung in der *German Mouse Clinic* unterzogen. In einem modifizierten SHIRPA-Test, der Auskunft über neurologische Auffälligkeiten der Mäuse gibt, wurden keine Unterschiede zwischen *Mct8*^{+/-} und *Mct8*^{-/-} Mäusen festgestellt. Versuche zum Bewegungsverhalten der Mäuse zeigten

ebenfalls keine Unterschiede auf. Dennoch konnten im *Open Field Test* das erste Mal Verhaltensauffälligkeiten bei *Mct8*-defizienten Mäusen nachgewiesen werden. *Mct8*-defiziente Mäuse zeigen ein reduziertes Angstverhalten, ähnlich dem von postnatal transient T_4 -behandelten Ratten (Yilmazer-Hanke et al. 2004). Aufgrund der reduzierten Aufnahme von T_3 in das Gehirn wäre aber eher ein hypothyreoter Phänotyp zu erwarten gewesen. Dieser zeigte sich bei $TR\alpha 1$ -defizienten Mäusen wie $TR\alpha^{+/R384C}$ (Venero et al. 2005), $TR\alpha 1^{-/-}$ (Guadano-Ferraz et al. 2003) und $TR\alpha^{0/0}$ (Wilcoxon et al. 2007) durch ein induziertes Angstverhalten. Die erhöhte Latenz bis zum Putzen sowie die verringerte Putzdauer ist jedoch eher mit dem Verhalten von hypothyreoten Ratten vergleichbar (Negishi et al. 2005). Das erhöhte Schmerzverhalten der *Mct8*-defizienten Mäuse deutete hingegen wieder auf eine erhöhte Wahrnehmung von T_3 in bestimmten Zellen hin (Edmondson et al. 1990; Bruno et al. 2005; Bruno et al. 2006). *Mct8*-defiziente Mäuse können jedoch auch nicht mit hyperthyreoten Nagern gleichgesetzt werden, da hier aufgrund des unveränderten Bewegungsverhaltens keine Anzeichen einer Hyperaktivität bei *Mct8*^{-y} Mäusen vorliegen (Redei et al. 2001; Sala-Roca et al. 2002). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass Neurone in bestimmten Gehirnregionen den hohen zirkulierenden T_3 -Konzentrationen ausgesetzt sind, falls die T_3 -Aufnahme in diese Zellen unabhängig von *Mct8* stattfindet. Andere Zellen jedoch, die auf *Mct8* als einzigen Schilddrüsenhormontransporter angewiesen sind, wären in diesem Fall hypothyreot. Die Schilddrüsenhormonkonzentration eines Neurons oder einer anderen Zielzelle ist also abhängig davon, welche Transporter in welcher Kombination exprimiert werden (Abb. 28).

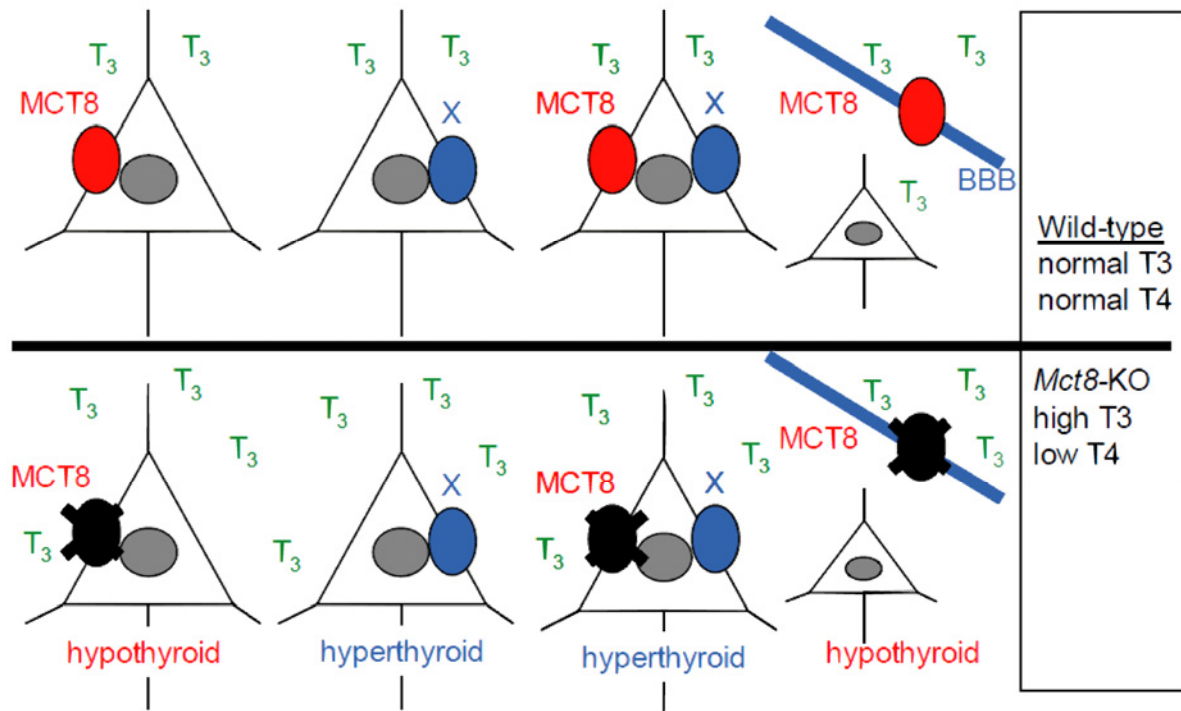


Abbildung 28: Modell der unterschiedlichen Transporterexpression und daraus resultierender zellulärer Aufnahme und Verfügbarkeit von T_3

Zellen exprimieren Mct8, einen anderen Schilddrüsenhormontransporter oder eine Kombination von Transportern. Die Schilddrüsenhormonkonzentration in der Zelle ist abhängig von den zirkulierenden Schilddrüsenhormonspiegeln. Bei *Mct8*-defizienten Zellen ist die Schilddrüsenhormonkonzentration davon abhängig, welche Transporter exprimiert werden: Zellen, die normalerweise nur Mct8 exprimieren, werden hypothyreot; Zellen, die einen anderen Transporter oder zusätzlich zu Mct8 andere Transporter exprimieren, werden aufgrund der hohen zirkulierenden T_3 -Spiegel hingegen hyperthyreot.

Aufgrund dieser Hypothese wurde die Expression von 14 Schilddrüsenhormontransportern in kultivierten kortikalen Neuronen der Maus untersucht. Sieben Transporter konnten detektiert werden. Neben Mct8 weisen die L-Typ Aminosäuretransporter, Lat1 und Lat2, die stärkste Expression auf. Die Expression der hier detektierten Transporter wurde nun im Detail in Neokortex, Hippocampus und Cerebellum während der Entwicklung untersucht. Hierbei konnte ein sehr spezifisches spatio-temporales Expressionsmuster dieser Schilddrüsenhormontransporter dargestellt werden. Die Zelltyp-spezifische Untersuchung der Schilddrüsenhormontransporter in kultivierten Neuronen, Astrozyten und Mikroglia zeigte die stärkste Expression von Mct8, Lat1 und Lat2 in Neuronen und Astrozyten. Lat1 und Lat2 sind auch in Mikroglia exprimiert. Spezifisch für Mikroglia ist ebenfalls die Expression von Mct10 und Slco4a1. Die in verschiedenen Gehirnregionen und Zelltypen untersuchten Schilddrüsenhormontransporter waren teilweise bereits vorher als Transporter der Blut-Hirn-Schranke beschrieben, so z. B. Lat1 und

Slco1c1 (Boado et al. 1999; Sugiyama et al. 2003; Chu et al. 2008; Roberts et al. 2008a; Roberts et al. 2008b).

Ist die *Mct8*-defiziente Maus nun ein gutes Modell für das Allan-Herndon-Dudley-Syndrom? Die vorliegenden Daten zum Phänotyp der Maus unterscheiden sich nicht nur auf den ersten Blick deutlich von dem bei mehr als 25 Patienten mit Allan-Herndon-Dudley-Syndrom beschriebenen Phänotyp. Die Frage nach Erklärungsmöglichkeiten für diese unterschiedliche Ausprägung des Verlustes von Mct8 drängt sich hier auf. Eine Maus ist natürlich auch in diesem Fall kein Mensch. Es besteht die Möglichkeit, dass der Mensch als entwicklungsbiologisch gesehen „höherer“ Organismus empfindlicher auf Störungen der HPT-Achse während der Entwicklung reagiert. Das Gehirn reagiert beim Menschen bekanntermaßen auf eine Störung der Schilddrüsenhormonwerte während der Entwicklung. Eine während der Entwicklung hypothyreote Maus zeigt allerdings auch einen deutlichen Phänotyp. Der Phänotyp von Allan-Herndon-Dudley Patienten lässt sich aber grundsätzlich nicht mit bekannten Phänotypen einer Hypothyreose während der Entwicklung, dem Kretinismus, vergleichen. Höhere Funktionen des Nervensystems, wie z. B. Sprache können generell in Mäusen nicht untersucht werden. Dennoch zeigen Menschen und Mäuse beim Verlust von Mct8 selbst bei so grundlegenden Funktionen wie Bewegung starke Unterschiede.

In Diskussionen zu diesem Thema taucht auch immer wieder die Frage auf, ob die *Mct8*-defiziente Maus mit einem kompletten Verlust des Gens ein gutes Modell für eine Erkrankung darstellt bei der die meisten Betroffenen Mutationen oder Teilverluste von MCT8 aufweisen, welche zu Fragmenten von MCT8 mit möglicherweise dominant-negativen Effekten führen könnten. Hierzu lässt sich nur anmerken, dass es auch Patienten mit sehr frühen Stoppmutationen oder großen Deletionen gibt, die im Vergleich zu anderen Patienten keine Veränderung des Phänotyps aufweisen. Ebenso repliziert die *Mct8*-defiziente Maus im Bezug auf die veränderten Schilddrüsenhormonspiegel den Phänotyp von Allan-Herndon-Dudley Patienten.

Eine weitere Möglichkeit wäre, dass MCT8 neben Schilddrüsenhormonen ein weiteres bisher unbekanntes Substrat transportieren könnte. Dieses Substrat sollte dann für den neurologischen Phänotyp verantwortlich sein. Generell lässt sich die Möglichkeit, dass MCT8 ein weiteres Substrat transportieren könnte, nicht

ausschließen. Dies ist aber dennoch hypothetisch und würde keine Erklärung liefern, wie ein Mangel dieses Substrats sich auswirken würde.

Roberts et al. schlagen als Erklärung für den Unterschied zwischen *Mct8*-defizienten Mäusen und Menschen die unterschiedliche Expression von *Slco1c1* in diesen vor (Roberts et al. 2008b). Diese Erklärung ist deshalb nicht stichhaltig, da *Slco1c1* eher ein T_4 - als T_3 -spezifischer Schilddrüsenhormontransporter ist (Sugiyama et al. 2003). Patienten mit dem Allan-Herndon-Dudley-Syndrom sind, wie bereits angemerkt, nicht mit congenital hypothyreoten Patienten, denen eine komplette Versorgung des Gehirns mit Schilddrüsenhormonen, also auch T_4 fehlt, zu vergleichen. Die ebenfalls von dieser Arbeitsgruppe gezeigte Expression von *Lat1* in der Blut-Hirn-Schranke des Menschen widerspricht dieser Theorie zusätzlich (Roberts et al. 2008a).

Die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse führten zu der Hypothese, dass ein anderer Transporter im Gehirn der Maus den Verlust von *Mct8* kompensieren kann, im Gehirn des Menschen jedoch nicht. In Neuronen und anderen Zellen des Gehirns ist *Mct8* nicht als alleiniger Schilddrüsenhormontransporter exprimiert. Die Expression anderer Transporter folgt einem spezifischen spatio-temporalen Muster, ebenfalls ein Hinweis für eine mögliche Kompensation. Es bietet sich als eine Erklärung die Möglichkeit an, dass z. B. im Gehirn des Menschen zu einem spezifischen Zeitpunkt oder in spezifischen Zellen der in der Maus kompensierende Transporter nicht exprimiert wird. Aufgrund der vorliegenden Daten erweist sich *Lat2* als guter Kandidat für eine solche Kompensation bei der Maus. Im adulten Gehirn des Menschen lässt sich neben *MCT8* auch die Expression der System-L Transporter *LAT1* und *LAT2* sowie *SLCO4A1* als auch von *SLCO1C1* feststellen. Die hohe Expression von *SLCO1C1* ist durch die Lokalisation in Gefäßen und in der Blut-Hirn-Schranke zu erklären. *LAT2* ist ebenfalls auf Proteinebene in humanem adulten Gehirn nachweisbar. Die immunhistochemische Untersuchung von menschlichen Gehirnen während der Entwicklung (Gestationswoche (GW) 13-40) zeigte keine neuronale Expression von *LAT2*. In GW 40 konnte lediglich eine Immunreaktivität von *LAT2* in Mikroglia festgestellt werden. *MCT8* ist jedoch deutlich ab GW 25 in Blutgefäßen sichtbar und zeigt ab GW 32 eine neuronale Färbung, die sich bis GW 40 verstärkt. Auch im adulten Gehirn bleibt diese neuronale Färbung bestehen. *MCT8* scheint also zu diesen Entwicklungszeitpunkten im menschlichen Gehirn nicht von *LAT2* kompensiert werden zu können. Aufgrund des humanen Phänotyps ist

MCT8 in der humanen Gehirnentwicklung wohl der einzige relevante neuronale T₃-Transporter.

Im Mausmodell zeigen die vorliegenden Ergebnisse, dass wenigstens ein Teil der Neuronen Zugang zu den erhöhten zirkulierenden T₃-Spiegeln hat. Dies könnte bei Patienten mit dem Allan-Herndon-Dudley-Syndrom auch im adulten Gehirn der Fall sein, da hier ja neben MCT8 auch LAT2 neuronal exprimiert wird. Dennoch konnte eine Normalisierung der zirkulierenden Schilddrüsenhormonspiegel durch die Gabe von PTU und T₄ in Patienten nicht zu einer Verbesserung der neurologischen Defizite beitragen. Periphere hyperthyreote Ausprägungen des Phänotyps, wie z. B. Tachykardie und hohe SHBG-Spiegel, ließen sich jedoch reduzieren (Wemeau et al. 2008).

4.7 Expression von Mct8 in der Schilddrüse

Schilddrüsenhormontransporter könnten auch in der Schilddrüse selbst eine wichtige Rolle spielen. Um aus den Thyrozyten freigesetzt zu werden, müssen Schilddrüsenhormone die Zellmembranen der Thyrozyten durchqueren. Hieraus ergibt sich die Notwendigkeit von Schilddrüsenhormontransportern in der Schilddrüse, speziell in Thyrozyten. Da Schilddrüsenhormontransporter bislang in der Schilddrüse nicht untersucht wurden und anhand von Western Blots bereits eine Expression von Mct8 in der Schilddrüse gezeigt werden konnte, wurde die Expression von Schilddrüsenhormontransportern und die Lokalisation von Mct8 untersucht. In murinen und humanen Schilddrüsen konnte eine überwiegende Expression von Mct8 festgestellt werden. In Schilddrüsen der Maus ist neben Mct8 noch eine deutliche Expression von Slco4a1 zu erkennen; in menschlichen Schilddrüsen ist neben MCT8 auch LAT2 exprimiert. Die anderen detektierbaren Transporter sind nur in sehr geringem Maße exprimiert. Da Mct8 der wichtigste Transporter in der Schilddrüse zu sein scheint, wurde dieser weiter untersucht. Mct8 zeigt eine spezifische basolaterale Lokalisation in murinen und humanen Thyrozyten. Ebenso konnte eine heterogene Expression in Schilddrüsen, wahrscheinlich in Zusammenhang mit der Biosynthese von Schilddrüsenhormonen, gezeigt werden. Diese basolaterale Lokalisation und der Bezug zur Biosynthese könnte für eine Funktion im Export von Schilddrüsenhormonen aus der Schilddrüse sprechen. Hierzu würden auch die erniedrigten T₄-Spiegel im Serum von *Mct8*-defizienten Mäusen

passen. Untersuchungen von Schilddrüsen *Mct8*-defizienter Mäuse zeigten deutlich vergrößerte Follikel mit zellulären Invaginationen ins Kolloid und nukleären Veränderungen, welche für papilläre Hyperplasien und Karzinome typisch sind. Die Entstehung dieser Karzinome war bei *Mct8*-defizienten Mäusen progressiv und trat bei altersentsprechenden Kontrollen nicht auf. Nur im Alter von über 600 Tagen wurden in Wildtyp-Mäusen kleinere papilläre Veränderungen gefunden.

Molekulare Untersuchungen von Schilddrüsenkarzinomen des Menschen haben verschiedene genetische Veränderungen offen gelegt. Zur Untersuchung dieser Veränderungen wurden mehrere Mausmodelle generiert und charakterisiert. Mäuse mit einer Mutation im Gen für den Schilddrüsenhormonrezeptor Beta ($TR\beta^{PV/PV}$) entwickeln zum Beispiel ein follikuläres Schilddrüsenkarzinom, welches invasiv wächst und Metastasen bildet (Suzuki et al. 2002). Es konnte ebenso gezeigt werden, dass bei diesen Mäusen der PI3K/AKT Signalweg stimuliert ist und eine Haploinsuffizienz des verwandten Rezeptors PTEN die Tumorentwicklung beschleunigt (Furuya et al. 2006; Guigon et al. 2009). Die Entwicklung von papillären Schilddrüsentumoren ist bei *RET/PTC3*-transgenen Mäusen untersucht worden. Diese entwickeln zusätzlich Metastasen in Lymphknoten (Powell et al. 1998). Papilläre Schilddrüsenkarzinome bei *BRAF*^{V600E}-transgenen Mäusen wachsen sehr schnell und invasiv (Knauf et al. 2005). Das Wachstum des papillären Schilddrüsenkarzinoms bei *Mct8*-defizienten Mäusen ist hingegen viel langsamer als in *RET/PTC3*- und *BRAF*^{V600E}-transgenen Mäusen. Es konnten auch keine Metastasen in Lymphknoten und kein invasives Wachstum beobachtet werden. Der Mechanismus der Tumorentstehung scheint also unterschiedlich zu den bisher beschriebenen Modellen zu sein. Falls man annimmt, dass *Mct8* eine Rolle beim Export von Schilddrüsenhormonen aus der Schilddrüse spielt, könnte bei *Mct8*-defizienten Mäusen eine lokale Hyperthyreose in der Schilddrüse vorliegen. Die starke und andauernde Stimulation des TSH-Rezeptors könnte die Proliferation von Thyrozyten anregen. Dies wurde bei Jod-defizienten Strumen und Morbus Basedow sowie bei Mutationen im Biosyntheseweg von Schilddrüsenhormonen beschrieben (Stocker and Burch 2003; Hishinuma et al. 2005). In einem Fall von Pendred-Syndrom mit einer bereits lange bestehenden Struma führten erhöhte TSH-Spiegel zu Hyperplasien, die bei einer Ansammlung weiterer Mutation in einer Neoplasie endeten (Camargo et al. 2001). In Anlehnung hieran könnten die erhöhten TSH-Werte bei *Mct8*-defizienten Mäusen das Wachstum und die Ausbildung von sehr

kleinen papillären Karzinomen begünstigen, die sonst eher unbemerkt blieben. Dennoch konnten bei Mausmodellen mit einer konstitutiven Aktivierung des TSH-Rezeptors nur Hyperplasien der Schilddrüse, jedoch keine Tumorentwicklung beobachtet werden.

Die hier dargestellten Ergebnisse aus dem Mausmodell führten zu einer erneuten Untersuchung der Schilddrüse eines in Berlin betreuten Patienten mit einer Mutation in MCT8. Bei diesem Patienten konnten tatsächlich Veränderungen in der Schilddrüse nachgewiesen werden, die denen der *Mct8*-defizienten Maus ähnelten. Da frühere Untersuchungen der Schilddrüse dieses Patienten noch keine Hinweise auf Veränderungen lieferten, wäre es angemessen bei allen Patienten mit Allan-Herndon-Dudley-Syndrom regelmäßige Kontrollen der Schilddrüse einzuführen. Das Mausmodell konnte hier auf einen neuen, für Patienten relevanten, Phänotyp bei *Mct8*-Defizienz hinweisen.

5. Referenzen

- Abe T, Kakyo M, Sakagami H, Tokui T, Nishio T, Tanemoto M, Nomura H, Hebert SC, Matsuno S, Kondo H, Yawo H (1998) Molecular characterization and tissue distribution of a new organic anion transporter subtype (oatp3) that transports thyroid hormones and taurocholate and comparison with oatp2. *J Biol Chem* 273:22395-401
- Allan W, Herndon CN, Dudley FC (1944) Some examples of the inheritance of mental deficiency: apparently sex-linked idiocy and microcephaly. *Am J Ment Defic* 48:325-334
- Arvan P, Kim PS, Kuliawat R, Prabakaran D, Muresan Z, Yoo SE, Abu Hossain S (1997) Intracellular protein transport to the thyrocyte plasma membrane: potential implications for thyroid physiology. *Thyroid* 7:89-105
- Auso E, Lavado-Autric R, Cuevas E, Del Rey FE, Morreale De Escobar G, Berbel P (2004) A moderate and transient deficiency of maternal thyroid function at the beginning of fetal neocortico-genesis alters neuronal migration. *Endocrinology* 145:4037-47
- Barres BA, Lazar MA, Raff MC (1994) A novel role for thyroid hormone, glucocorticoids and retinoic acid in timing oligodendrocyte development. *Development* 120:1097-108
- Bassi MT, Sperandeo MP, Incerti B, Bulfone A, Pepe A, Surace EM, Gattuso C, De Grandi A, Buoninconti A, Riboni M, Manzoni M, Andria G, Ballabio A, Borsani G, Sebastio G (1999) SLC7A8, a gene mapping within the lysinuric protein intolerance critical region, encodes a new member of the glycoprotein-associated amino acid transporter family. *Genomics* 62:297-303
- Beraud T, Cruchaud J, Vannotti A (1958) [Effects of specific protein support of thyroxin on its cellular penetration.]. *Schweiz Med Wochenschr* 88:105-7
- Bianco AC, Salvatore D, Gereben B, Berry MJ, Larsen PR (2002) Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases. *Endocr Rev* 23:38-89
- Biebermann H, Ambrugger P, Tarnow P, von Moers A, Schweizer U, Grueters A (2005) Extended clinical phenotype, endocrine investigations and functional studies of a loss-of-function mutation A150V in the thyroid hormone specific transporter MCT8. *Eur J Endocrinol* 153:359-66
- Boado RJ, Li JY, Nagaya M, Zhang C, Pardridge WM (1999) Selective expression of the large neutral amino acid transporter at the blood-brain barrier. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:12079-84
- Bruno AN, Fontella FU, Bonan CD, Barreto-Chaves ML, Dalmaz C, Sarkis JJ (2006) Activation of adenosine A(1) receptors alters behavioral and biochemical parameters in hyperthyroid rats. *Behav Brain Res* 167:287-94
- Bruno AN, Fontella FU, Crema LM, Bonan CD, Dalmaz C, Barreto-Chaves ML, Sarkis JJ (2005) Hyperthyroidism changes nociceptive response and ecto-nucleotidase activities in synaptosomes from spinal cord of rats in different phases of development. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 140:111-6
- Camargo R, Limbert E, Gillam M, Henriques MM, Fernandes C, Catarino AL, Soares J, Alves VA, Kopp P, Medeiros-Neto G (2001) Aggressive metastatic follicular

- thyroid carcinoma with anaplastic transformation arising from a long-standing goiter in a patient with Pendred's syndrome. *Thyroid* 11:981-8
- Campos-Barros A, Amma LL, Faris JS, Shailam R, Kelley MW, Forrest D (2000) Type 2 iodothyronine deiodinase expression in the cochlea before the onset of hearing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:1287-92
- Cannon B, Nedergaard J (2004) Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev* 84:277-359
- Cattori V, Hagenbuch B, Hagenbuch N, Stieger B, Ha R, Winterhalter KE, Meier PJ (2000) Identification of organic anion transporting polypeptide 4 (Oatp4) as a major full-length isoform of the liver-specific transporter-1 (rlst-1) in rat liver. *FEBS Lett* 474:242-5
- Chomczynski P, Rymaszewski M (2006) Alkaline polyethylene glycol-based method for direct PCR from bacteria, eukaryotic tissue samples, and whole blood. *Biotechniques* 40:454, 456, 458
- Christensen HN, Hess B, Riggs TR (1954) Concentration of taurine, beta-alanine, and triiodothyronine by ascites carcinoma cells. *Cancer Res* 14:124-7
- Chu C, Li JY, Boado RJ, Pardridge WM (2008) Blood-brain barrier genomics and cloning of a novel organic anion transporter. *J Cereb Blood Flow Metab* 28:291-301
- Crispell KR, Coleman J (1956) A study of the relative binding capacity of plasma proteins, intact human red cells, and human red cell stroma for radioactive I-131 labeled L-thyroxine. *J Clin Invest* 35:475-80
- Dai G, Levy O, Carrasco N (1996) Cloning and characterization of the thyroid iodide transporter. *Nature* 379:458-60
- De Deken X, Wang D, Many MC, Costagliola S, Libert F, Vassart G, Dumont JE, Miot F (2000) Cloning of two human thyroid cDNAs encoding new members of the NADPH oxidase family. *J Biol Chem* 275:23227-33
- De La Vieja A, Dohan O, Levy O, Carrasco N (2000) Molecular analysis of the sodium/iodide symporter: impact on thyroid and extrathyroid pathophysiology. *Physiol Rev* 80:1083-105
- Di Cosmo C, Liao XH, Dumitrescu AM, Weiss RE, Refetoff S (2009) A thyroid hormone analog with reduced dependence on the monocarboxylate transporter 8 for tissue transport. *Endocrinology* 150:4450-8
- Dimitriadis GD, Raptis SA (2001) Thyroid hormone excess and glucose intolerance. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 109 Suppl 2:S225-39
- Docter R, Friesema EC, van Stralen PG, Krenning EP, Everts ME, Visser TJ, Hennemann G (1997) Expression of rat liver cell membrane transporters for thyroid hormone in *Xenopus laevis* oocytes. *Endocrinology* 138:1841-6
- Dohan O, De la Vieja A, Paroder V, Riedel C, Artani M, Reed M, Ginter CS, Carrasco N (2003) The sodium/iodide Symporter (NIS): characterization, regulation, and medical significance. *Endocr Rev* 24:48-77
- Dumitrescu AM, Liao XH, Best TB, Brockmann K, Refetoff S (2004) A novel syndrome combining thyroid and neurological abnormalities is associated with mutations in a monocarboxylate transporter gene. *Am J Hum Genet* 74:168-75
- Dumitrescu AM, Liao XH, Weiss RE, Millen K, Refetoff S (2006) Tissue-specific thyroid hormone deprivation and excess in monocarboxylate transporter (mct) 8-deficient mice. *Endocrinology* 147:4036-43
- Duntas LH (2002) Thyroid disease and lipids. *Thyroid* 12:287-93
- Eckel J, Rao GS, Rao ML, Breuer H (1979) Uptake of L-tri-iodothyronine by isolated rat liver cells. A process partially inhibited by metabolic inhibitors; attempts to

- distinguish between uptake and binding to intracellular proteins. *Biochem J* 182:473-91
- Edmondson EA, Bonnet KA, Friedhoff AJ (1990) The effect of hyperthyroidism on opiate receptor binding and pain sensitivity. *Life Sci* 47:2283-9
- Freinkel N, Ingbar SH, Dowling JT (1957) The influence of extracellular thyroxine-binding protein upon the accumulation of thyroxine by tissue slices. *J Clin Invest* 36:25-37
- Friedrichs B, Tepel C, Reinheckel T, Deussing J, von Figura K, Herzog V, Peters C, Saftig P, Brix K (2003) Thyroid functions of mouse cathepsins B, K, and L. *J Clin Invest* 111:1733-45
- Friesema EC, Docter R, Moerings EP, Stieger B, Hagenbuch B, Meier PJ, Krenning EP, Hennemann G, Visser TJ (1999) Identification of thyroid hormone transporters. *Biochem Biophys Res Commun* 254:497-501
- Friesema EC, Docter R, Moerings EP, Verrey F, Krenning EP, Hennemann G, Visser TJ (2001) Thyroid hormone transport by the heterodimeric human system L amino acid transporter. *Endocrinology* 142:4339-48
- Friesema EC, Ganguly S, Abdalla A, Manning Fox JE, Halestrap AP, Visser TJ (2003) Identification of monocarboxylate transporter 8 as a specific thyroid hormone transporter. *J Biol Chem* 278:40128-35
- Friesema EC, Grueters A, Biebermann H, Krude H, von Moers A, Reeser M, Barrett TG, Mancilla EE, Svensson J, Kester MH, Kuiper GG, Balkassmi S, Uitterlinden AG, Koehrle J, Rodien P, Halestrap AP, Visser TJ (2004) Association between mutations in a thyroid hormone transporter and severe X-linked psychomotor retardation. *Lancet* 364:1435-7
- Friesema EC, Jansen J, Jachtenberg JW, Visser WE, Kester MH, Visser TJ (2008) Effective cellular uptake and efflux of thyroid hormone by human monocarboxylate transporter 10. *Mol Endocrinol* 22:1357-69
- Friesema EC, Visser WE, Visser TJ (2010) Genetics and phenomics of thyroid hormone transport by MCT8. *Mol Cell Endocrinol*
- Fujiwara K, Adachi H, Nishio T, Unno M, Tokui T, Okabe M, Onogawa T, Suzuki T, Asano N, Tanemoto M, Seki M, Shiiba K, Suzuki M, Kondo Y, Nunoki K, Shimosegawa T, Iinuma K, Ito S, Matsuno S, Abe T (2001) Identification of thyroid hormone transporters in humans: different molecules are involved in a tissue-specific manner. *Endocrinology* 142:2005-12
- Furuya F, Hanover JA, Cheng SY (2006) Activation of phosphatidylinositol 3-kinase signaling by a mutant thyroid hormone beta receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:1780-5
- Gilbert ME, Sui L, Walker MJ, Anderson W, Thomas S, Smoller SN, Schon JP, Phani S, Goodman JH (2007) Thyroid hormone insufficiency during brain development reduces parvalbumin immunoreactivity and inhibitory function in the hippocampus. *Endocrinology* 148:92-102
- Gross J, Pitt-Rivers R (1952) The identification of 3:5:3'-L-triiodothyronine in human plasma. *Lancet* 1:439-41
- Guadano-Ferraz A, Benavides-Piccione R, Venero C, Lancha C, Vennstrom B, Sandi C, DeFelipe J, Bernal J (2003) Lack of thyroid hormone receptor alpha1 is associated with selective alterations in behavior and hippocampal circuits. *Mol Psychiatry* 8:30-8
- Guigon CJ, Zhao L, Willingham MC, Cheng SY (2009) PTEN deficiency accelerates tumour progression in a mouse model of thyroid cancer. *Oncogene* 28:509-17

- Hamolsky MW, Ellison HE, Freedberg AS (1957) The thyroid hormone plasma protein complex in man. I. Differences in different states of thyroid function. *J Clin Invest* 36:1486-97
- Harington CR, Barger G (1927) Chemistry of Thyroxine: Constitution and Synthesis of Thyroxine. *Biochem J* 21:169-83
- Hatcher JP, Jones DN, Rogers DC, Hatcher PD, Reavill C, Hagan JJ, Hunter AJ (2001) Development of SHIRPA to characterise the phenotype of gene-targeted mice. *Behav Brain Res* 125:43-7
- Heuer H, Mason CA (2003) Thyroid hormone induces cerebellar Purkinje cell dendritic development via the thyroid hormone receptor $\alpha 1$. *J Neurosci* 23:10604-12
- Hillier AP (1968) The uptake and release of thyroxine and triiodothyronine by the perfused rat heart. *J Physiol* 199:151-60
- Hillier AP (1969a) The release of thyroxine from serum protein in the vessels of the liver. *J Physiol* 203:419-34
- Hillier AP (1969b) The uptake of thyroxine and tri-iodothyronine by perfused hearts. *J Physiol* 203:665-74
- Hishinuma A, Fukata S, Kakudo K, Murata Y, Ieiri T (2005) High incidence of thyroid cancer in long-standing goiters with thyroglobulin mutations. *Thyroid* 15:1079-84
- Hogness JR, Lee ND, Berg MK, Williams RH (1957) The concentration and binding of thyroxine and triiodothyronine by rat diaphragm. *J Clin Invest* 36:803-9
- Holden KR, Zuniga OF, May MM, Su H, Molinero MR, Rogers RC, Schwartz CE (2005) X-linked MCT8 gene mutations: characterization of the pediatric neurologic phenotype. *J Child Neurol* 20:852-7
- Ishii S, Kamegai J, Tamura H, Shimizu T, Sugihara H, Oikawa S (2008) Triiodothyronine (T3) stimulates food intake via enhanced hypothalamic AMP-activated kinase activity. *Regul Pept* 151:164-9
- Ishizuya-Oka A, Hasebe T, Shi YB (2009) Apoptosis in amphibian organs during metamorphosis. *Apoptosis*
- Jones SA, Jolson DM, Cuta KK, Mariash CN, Anderson GW (2003) Triiodothyronine is a survival factor for developing oligodendrocytes. *Mol Cell Endocrinol* 199:49-60
- Kim DK, Kanai Y, Chairoungdua A, Matsuo H, Cha SH, Endou H (2001) Expression cloning of a Na⁺-independent aromatic amino acid transporter with structural similarity to H⁺/monocarboxylate transporters. *J Biol Chem* 276:17221-8
- Kim DK, Kanai Y, Matsuo H, Kim JY, Chairoungdua A, Kobayashi Y, Enomoto A, Cha SH, Goya T, Endou H (2002) The human T-type amino acid transporter-1: characterization, gene organization, and chromosomal location. *Genomics* 79:95-103
- Kinne A, Roth S, Biebermann H, Köhrle J, Gruters A, Schweizer U (2009) Surface translocation and tri-iodothyronine uptake of mutant MCT8 proteins are cell type-dependent. *J Mol Endocrinol* 43:263-71
- Knauf JA, Ma X, Smith EP, Zhang L, Mitsutake N, Liao XH, Refetoff S, Nikiforov YE, Fagin JA (2005) Targeted expression of BRAFV600E in thyroid cells of transgenic mice results in papillary thyroid cancers that undergo dedifferentiation. *Cancer Res* 65:4238-45
- Köhrle J (2002) Iodothyronine deiodinases. *Methods Enzymol* 347:125-67
- Kong WM, Martin NM, Smith KL, Gardiner JV, Connoley IP, Stephens DA, Dhillo WS, Ghatei MA, Small CJ, Bloom SR (2004) Triiodothyronine stimulates food

- intake via the hypothalamic ventromedial nucleus independent of changes in energy expenditure. *Endocrinology* 145:5252-8
- Krenning EP, Docter R, Bernard HF, Visser TJ, Hennemann G (1978) Active transport of triiodothyronine (T3) into isolated rat liver cells. *FEBS Lett* 91:113-6
- Krenning EP, Docter R, Bernard HF, Visser TJ, Hennemann G (1979) The essential role of albumin in the active transport of thyroid hormones into primary cultured rat hepatocytes. *FEBS Lett* 107:227-30
- Lafreniere RG, Carrel L, Willard HF (1994) A novel transmembrane transporter encoded by the XPCT gene in Xq13.2. *Hum Mol Genet* 3:1133-9
- Lein A, Dowben RM (1961) Uptake and binding of thyroxine and triiodothyronine by rat diaphragm in vitro. *Am J Physiol* 200:1029-31
- Lima FR, Gervais A, Colin C, Izembart M, Neto VM, Mallat M (2001) Regulation of microglial development: a novel role for thyroid hormone. *J Neurosci* 21:2028-38
- Lu A, Ng L, Ma M, Kefas B, Davies TF, Hernandez A, Chan CC, Forrest D (2009) Retarded developmental expression and patterning of retinal cone opsins in hypothyroid mice. *Endocrinology* 150:1536-44
- Maglott DR, Durkin AS, Lane SA, Callen DF, Feldblyum TV, Nierman WC (1994) The gene for membrane protein E16 (D16S469E) maps to human chromosome 16q24.3 and is expressed in human brain, thymus, and retina. *Genomics* 23:303-4
- Magnus-Levy A (1895) Ueber den respiratorischen Gaswechsel unter dem Einfluss der Thyroidea sowie unter verschiedenen pathologischen Zuständen. *Berlin Klin Wochenschr* 32:650-652
- Mannion BA, Kolesnikova TV, Lin SH, Wang S, Thompson NL, Hemler ME (1998) The light chain of CD98 is identified as E16/TA1 protein. *J Biol Chem* 273:33127-9
- Mikkaichi T, Suzuki T, Onogawa T, Tanemoto M, Mizutamari H, Okada M, Chaki T, Masuda S, Tokui T, Eto N, Abe M, Satoh F, Unno M, Hishinuma T, Inui K, Ito S, Goto J, Abe T (2004) Isolation and characterization of a digoxin transporter and its rat homologue expressed in the kidney. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:3569-74
- Moller N, Nielsen S, Nyholm B, Porksen N, Alberti KG, Weeke J (1996) Glucose turnover, fuel oxidation and forearm substrate exchange in patients with thyrotoxicosis before and after medical treatment. *Clin Endocrinol (Oxf)* 44:453-9
- Morte B, Ceballos A, Diez D, Grijota-Martinez C, Dumitrescu AM, Di Cosmo C, Galton VA, Refetoff S, Bernal J (2010) Thyroid Hormone-Regulated Mouse Cerebral Cortex Genes Are Differentially Dependent on the Source of the Hormone: A Study in Monocarboxylate Transporter-8- and Deiodinase-2-Deficient Mice. *Endocrinology*
- Namba N, Etani Y, Kitaoka T, Nakamoto Y, Nakacho M, Bessho K, Miyoshi Y, Mushiake S, Mohri I, Arai H, Taniike M, Ozono K (2008) Clinical phenotype and endocrinological investigations in a patient with a mutation in the MCT8 thyroid hormone transporter. *Eur J Pediatr* 167:785-91
- Negishi T, Kawasaki K, Sekiguchi S, Ishii Y, Kyuwa S, Kuroda Y, Yoshikawa Y (2005) Attention-deficit and hyperactive neurobehavioural characteristics induced by perinatal hypothyroidism in rats. *Behav Brain Res* 159:323-31
- Ng L, Goodyear RJ, Woods CA, Schneider MJ, Diamond E, Richardson GP, Kelley MW, Germain DL, Galton VA, Forrest D (2004) Hearing loss and retarded

- cochlear development in mice lacking type 2 iodothyronine deiodinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:3474-9
- Ng L, Hernandez A, He W, Ren T, Srinivas M, Ma M, Galton VA, St Germain DL, Forrest D (2009) A protective role for type 3 deiodinase, a thyroid hormone-inactivating enzyme, in cochlear development and auditory function. *Endocrinology* 150:1952-60
- Ng L, Lyubarsky A, Nikonov SS, Ma M, Srinivas M, Kefas B, St Germain DL, Hernandez A, Pugh EN, Jr., Forrest D (2010) Type 3 deiodinase, a thyroid-hormone-inactivating enzyme, controls survival and maturation of cone photoreceptors. *J Neurosci* 30:3347-57
- Oetting A, Yen PM (2007) New insights into thyroid hormone action. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 21:193-208
- Papadimitriou A, Dumitrescu AM, Papavasiliou A, Fretzayas A, Nicolaidou P, Refetoff S (2008) A novel monocarboxylate transporter 8 gene mutation as a cause of severe neonatal hypotonia and developmental delay. *Pediatrics* 121:e199-202
- Pizzagalli F, Hagenbuch B, Stieger B, Klenk U, Folkers G, Meier PJ (2002) Identification of a novel human organic anion transporting polypeptide as a high affinity thyroxine transporter. *Mol Endocrinol* 16:2283-96
- Powell DJ, Jr., Russell J, Nibu K, Li G, Rhee E, Liao M, Goldstein M, Keane WM, Santoro M, Fusco A, Rothstein JL (1998) The RET/PTC3 oncogene: metastatic solid-type papillary carcinomas in murine thyroids. *Cancer Res* 58:5523-8
- Redei EE, Solberg LC, Kluczynski JM, Pare WP (2001) Paradoxical hormonal and behavioral responses to hypothyroid and hyperthyroid states in the Wistar-Kyoto rat. *Neuropsychopharmacology* 24:632-9
- Richardson SJ (2007) Cell and molecular biology of transthyretin and thyroid hormones. *Int Rev Cytol* 258:137-93
- Ritchie JW, Peter GJ, Shi YB, Taylor PM (1999) Thyroid hormone transport by 4F2hc-IU12 heterodimers expressed in *Xenopus* oocytes. *J Endocrinol* 163:R5-9
- Robbins J, Rall JE (1960) Proteins associated with the thyroid hormones. *Physiol Rev* 40:415-89
- Roberts LM, Black DS, Raman C, Woodford K, Zhou M, Haggerty JE, Yan AT, Cwirla SE, Grindstaff KK (2008a) Subcellular localization of transporters along the rat blood-brain barrier and blood-cerebral-spinal fluid barrier by in vivo biotinylation. *Neuroscience* 155:423-38
- Roberts LM, Woodford K, Zhou M, Black DS, Haggerty JE, Tate EH, Grindstaff KK, Mengesha W, Raman C, Zerangue N (2008b) Expression of the thyroid hormone transporters monocarboxylate transporter-8 (SLC16A2) and organic ion transporter-14 (SLCO1C1) at the blood-brain barrier. *Endocrinology* 149:6251-61
- Roberts MR, Srinivas M, Forrest D, Morreale de Escobar G, Reh TA (2006) Making the gradient: thyroid hormone regulates cone opsin expression in the developing mouse retina. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:6218-23
- Royaux IE, Suzuki K, Mori A, Katoh R, Everett LA, Kohn LD, Green ED (2000) Pendrin, the protein encoded by the Pendred syndrome gene (PDS), is an apical porter of iodide in the thyroid and is regulated by thyroglobulin in FRTL-5 cells. *Endocrinology* 141:839-45
- Sala-Roca J, Marti-Carbonell MA, Garau A, Darbra S, Balada F (2002) Effects of dysthyroidism in plus maze and social interaction tests. *Pharmacol Biochem Behav* 72:643-50

- Schwartz CE, May MM, Carpenter NJ, Rogers RC, Martin J, Bialer MG, Ward J, Sanabria J, Marsa S, Lewis JA, Echeverri R, Lubs HA, Voeller K, Simensen RJ, Stevenson RE (2005) Allan-Herndon-Dudley syndrome and the monocarboxylate transporter 8 (MCT8) gene. *Am J Hum Genet* 77:41-53
- Schweizer U, Weitzel JM, Schomburg L (2008) Think globally: act locally. New insights into the local regulation of thyroid hormone availability challenge long accepted dogmas. *Mol Cell Endocrinol* 289:1-9
- Sharlin DS, Tighe D, Gilbert ME, Zoeller RT (2008) The balance between oligodendrocyte and astrocyte production in major white matter tracts is linearly related to serum total thyroxine. *Endocrinology* 149:2527-36
- Sijens PE, Rodiger LA, Meiners LC, Lunsing RJ (2008) ¹H magnetic resonance spectroscopy in monocarboxylate transporter 8 gene deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 93:1854-9
- Silva JE (1995) Thyroid hormone control of thermogenesis and energy balance. *Thyroid* 5:481-92
- Silva JE (2006) Thermogenic mechanisms and their hormonal regulation. *Physiol Rev* 86:435-64
- Simonides WS, Thelen MH, van der Linden CG, Muller A, van Hardeveld C (2001) Mechanism of thyroid-hormone regulated expression of the SERCA genes in skeletal muscle: implications for thermogenesis. *Biosci Rep* 21:139-54
- Sjogren M, Alkemade A, Mittag J, Nordstrom K, Katz A, Rozell B, Westerblad H, Arner A, Vennstrom B (2007) Hypermetabolism in mice caused by the central action of an unliganded thyroid hormone receptor alpha1. *Embo J* 26:4535-45
- Spangenberg DB (1971) Thyroxine induced metamorphosis in Aurelia. *J Exp Zool* 178:183-94
- St Germain DL, Galton VA, Hernandez A (2009) Minireview: Defining the roles of the iodothyronine deiodinases: current concepts and challenges. *Endocrinology* 150:1097-107
- Stocker DJ, Burch HB (2003) Thyroid cancer yield in patients with Graves' disease. *Minerva Endocrinol* 28:205-12
- Sugiyama D, Kusuhara H, Taniguchi H, Ishikawa S, Nozaki Y, Aburatani H, Sugiyama Y (2003) Functional characterization of rat brain-specific organic anion transporter (Oatp14) at the blood-brain barrier: high affinity transporter for thyroxine. *J Biol Chem* 278:43489-95
- Suzuki H, Willingham MC, Cheng SY (2002) Mice with a mutation in the thyroid hormone receptor beta gene spontaneously develop thyroid carcinoma: a mouse model of thyroid carcinogenesis. *Thyroid* 12:963-9
- Suzuki T, Onogawa T, Asano N, Mizutamari H, Mikkaichi T, Tanemoto M, Abe M, Satoh F, Unno M, Nunoki K, Suzuki M, Hishinuma T, Goto J, Shimosegawa T, Matsuno S, Ito S, Abe T (2003) Identification and characterization of novel rat and human gonad-specific organic anion transporters. *Mol Endocrinol* 17:1203-15
- Taurog A (1996) Hormone synthesis: thyroid hormone metabolism. In: Braverman LE, Utiger RD (eds) *The thyroid-a fundamental and clinical text*. Lippincott-Raven, Philadelphia, pp 47-81
- Trajkovic M, Visser TJ, Mittag J, Horn S, Lukas J, Darras VM, Raivich G, Bauer K, Heuer H (2007) Abnormal thyroid hormone metabolism in mice lacking the monocarboxylate transporter 8. *J Clin Invest* 117:627-35
- Trajkovic-Arsic M, Visser TJ, Darras VM, Friesema EC, Schlott B, Mittag J, Bauer K, Heuer H (2010) Consequences of monocarboxylate transporter 8 deficiency

- for renal transport and metabolism of thyroid hormones in mice. *Endocrinology* 151:802-9
- Uziel A (1986) Periods of sensitivity to thyroid hormone during the development of the organ of Corti. *Acta Otolaryngol Suppl* 429:23-7
- Vaurs-Barriere C, Deville M, Sarret C, Giraud G, Des Portes V, Prats-Vinas JM, De Michele G, Dan B, Brady AF, Boespflug-Tanguy O, Touraine R (2009) Pelizaeus-Merzbacher-Like disease presentation of MCT8 mutated male subjects. *Ann Neurol* 65:114-8
- Venero C, Guadano-Ferraz A, Herrero AI, Nordstrom K, Manzano J, de Escobar GM, Bernal J, Vennstrom B (2005) Anxiety, memory impairment, and locomotor dysfunction caused by a mutant thyroid hormone receptor alpha1 can be ameliorated by T3 treatment. *Genes Dev* 19:2152-63
- Visser WE, Jansen J, Friesema EC, Kester MH, Mancilla E, Lundgren J, van der Knaap MS, Lunsing RJ, Brouwer OF, Visser TJ (2009a) Novel pathogenic mechanism suggested by ex vivo analysis of MCT8 (SLC16A2) mutations. *Hum Mutat* 30:29-38
- Visser WE, Philp NJ, van Dijk TB, Klootwijk W, Friesema EC, Jansen J, Beesley PW, Ianculescu AG, Visser TJ (2009b) Evidence for a homodimeric structure of human monocarboxylate transporter 8. *Endocrinology* 150:5163-70
- Weinstein SP, O'Boyle E, Fisher M, Haber RS (1994) Regulation of GLUT2 glucose transporter expression in liver by thyroid hormone: evidence for hormonal regulation of the hepatic glucose transport system. *Endocrinology* 135:649-54
- Wemeau JL, Pigeyre M, Proust-Lemoine E, d'Herbomez M, Gottrand F, Jansen J, Visser TJ, Ladsous M (2008) Beneficial effects of propylthiouracil plus L-thyroxine treatment in a patient with a mutation in MCT8. *J Clin Endocrinol Metab* 93:2084-8
- Wilcoxon JS, Nadolski GJ, Samarut J, Chassande O, Redei EE (2007) Behavioral inhibition and impaired spatial learning and memory in hypothyroid mice lacking thyroid hormone receptor alpha. *Behav Brain Res* 177:109-16
- Yilmazer-Hanke DM, Hantsch M, Hanke J, Schulz C, Faber-Zuschratter H, Schwegler H (2004) Neonatal thyroxine treatment: changes in the number of corticotropin-releasing-factor (CRF) and neuropeptide Y (NPY) containing neurons and density of tyrosine hydroxylase positive fibers (TH) in the amygdala correlate with anxiety-related behavior of wistar rats. *Neuroscience* 124:283-97
- Zoeller RT, Rovet J (2004) Timing of thyroid hormone action in the developing brain: clinical observations and experimental findings. *J Neuroendocrinol* 16:809-18

Publikationen

Braun D, Kinne A, Bräuer AU, Sapin R, Klein MO, Köhrle J, **Wirth EK***, Schweizer U*.

Developmental and cell type-specific expression of thyroid hormone transporters in the mouse brain and primary brain cells.

eingereicht

Braun D, **Wirth EK**, Schweizer U.

Thyroid hormone transporters in the brain.

Rev Neurosci. angenommen

Roth S, Zhang S, Chiu J, **Wirth EK**, Schweizer U.

Development of a serum-free supplement for primary neuron culture reveals the interplay of selenium and vitamin E in neuronal survival.

J Trace Elem Med Biol. 2010 Apr;24(2):130-7. Epub 2010 Feb 2.

Wirth EK, Conrad M, Winterer J, Wozny C, Carlson BA, Roth S, Schmitz D, Bornkamm GW, Coppola V, Tessarollo L, Schomburg L, Köhrle J, Hatfield DL, Schweizer U.

Neuronal selenoprotein expression is required for interneuron development and prevents seizures and neurodegeneration.

FASEB J. 2010 Mar;24(3):844-52. Epub 2009 Nov 4.

Wirth EK*, Roth S*, Blechschmidt C, Hölter SM, Becker L, Racz I, Zimmer A, Klopstock T, Gailus-Durner V, Fuchs H, Wurst W, Naumann T, Bräuer A, de Angelis MH, Köhrle J, Grüters A, Schweizer U.

Neuronal 3',3,5-triiodothyronine (T3) uptake and behavioral phenotype of mice deficient in Mct8, the neuronal T3 transporter mutated in Allan-Herndon-Dudley syndrome.

J Neurosci. 2009 Jul 29;29(30):9439-49.

Valentini L, **Wirth EK**, Schweizer U, Hengstermann S, Schaper L, Koernicke T, Dietz E, Norman K, Buning C, Winklhofer-Roob BM, Lochs H, Ockenga J.

Circulating adipokines and the protective effects of hyperinsulinemia in inflammatory bowel disease.

Nutrition. 2009 Feb;25(2):172-81. Epub 2008 Oct 11.

Seiler A, Schneider M, Förster H, Roth S, **Wirth EK**, Culmsee C, Plesnila N, Kremmer E, Rådmark O, Wurst W, Bornkamm GW, Schweizer U, Conrad M. Glutathione peroxidase 4 senses and translates oxidative stress into 12/15-lipoxygenase dependent- and AIF-mediated cell death.

Cell Metab. 2008 Sep;8(3):237-48.

* gleichwertiger Beitrag

Danksagung

Mein herzlichster Dank geht zuerst an meinen Mentor und Projektbetreuer Dr. Ulrich Schweizer. Seine großartige fachliche Kompetenz und seine Fähigkeit zu motivieren und zu eigenem Denken anzuregen hat mir den Eintritt in die Welt der Wissenschaft sehr einfach gestaltet und meinen Wunsch dort zu verweilen geprägt.

Prof. Dr. Annette Grüters-Kieslich möchte ich herzlich für die Möglichkeit zur Promotion, die Überlassung dieses extrem spannenden Promotionsthemas und für die regen fachlichen und auch menschlich sehr angenehmen Diskussionen danken.

Prof. Dr. Josef Köhrle gilt als Leiter des Instituts für Experimentelle Endokrinologie mein großer Dank für die Möglichkeit zur Promotion in seinem Institut. Von seinem immensen Wissen konnte ich durch zahlreiche Gespräche profitieren.

Prof. Dr. Werner Kloas danke ich herzlich für die Übernahme der Betreuung meiner Arbeit. Ein kleiner Einblick in die Arbeit mit *Xenopus laevis* war äußerst spannend.

Prof. Dr. Klaudia Brix sei besonders für das Interesse an meiner Arbeit gedankt. Sie ist eine wunderbare Mentorin und vermag es mit ihrem Elan und Eifer zu begeistern.

Besonders danken möchte ich auch dem Graduiertenkolleg 1208. Die Möglichkeiten zur Aus- und Weiterbildung waren großartig und reichlich vorhanden. Mentoren und Betreuer waren immer für Gespräche offen und gaben gute Ratschläge. Allen Assoziierten und Stipendiaten möchte ich für die tolle Atmosphäre, die gute Unterstützung und viele schöne Stunden danken.

Allen Kollegen am Institut für Experimentelle Endokrinologie möchte ich ganz besonders danken. Die Atmosphäre ist einfach sehr angenehm und freundschaftlich. Anja Fischbach, Antje Kretschmer und Vartitér Seher danke ich für die großartige Hilfe und Unterstützung bei vielen Experimenten.

Meinen Mitdoktoranden Stephan Roth, Anita Kinne, Doreen Braun, Carolin Höfig, Tobias Endermann, Thomas Behrends, Mette Stödter, Antonia Hög, Franziska Wohlgemuth und den ehemaligen Doktoranden Dr. Inka Gotthardt, Dr. Kostja Renko, Dr. Peter Hofmann, Dr. Marten Michaelis und Dr. Susanne Piehl danke ich für die

tolle kollegiale Stimmung, die Unterstützung bei Problemen und viele hilfreiche Ratschläge.

Abschließend möchte ich mich bei meinen Eltern und Thorsten bedanken. Sie waren immer für mich da und haben mich zu jeder Zeit unterstützt und motiviert.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel „Untersuchungen zur Rolle des Monocarboxylattransporters 8 anhand des Knock-out Mausmodells“ selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe.

Des Weiteren erkläre ich von der dem angestrebten Verfahren zugrunde liegenden Promotionsverordnung Kenntnis genommen zu haben. Ich versichere, dass ich die vorliegende Arbeit weder in dieser noch einer anderen Form bei einer anderen Prüfungsbehörde eingereicht habe und dass ich nicht im Besitz eines entsprechenden Doktorgrades bin.

Berlin, den

.....

Eva Katrin Wirth